



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2012

**CLÁUDIO ARAÚJO  
DOS REIS**

**A IMUNIDADE INATA NA INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA: PAPEL DOS MONÓCITOS**



**CLÁUDIO ARAÚJO  
DOS REIS**

**A IMUNIDADE INATA NA INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA: PAPEL DOS MONÓCITOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Tiago de Sousa Pinto Guimarães, Professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, e coorientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora associada com agregação, da Universidade de Aveiro

## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor André Miguel Afonso de Sousa Moreira**  
professor auxiliar convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Prof. Doutor João Tiago de Sousa Pinto Guimarães**  
professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Professor Doutor João Tiago Guimarães, por ter contribuído na minha formação profissional e pessoal. Agradeço a orientação prestada, a confiança depositada e a leitura crítica da tese.

À minha coorientadora Professora Doutora Conceição Santos, agradeço a disponibilidade e leitura crítica da tese de mestrado.

À Doutora Cristina Marquês pela disponibilidade demonstrada e pelas importantes dicas fornecidas ao longo da realização deste trabalho.

À Conceição e à Sónia pelo apoio demonstrado.

À Alexandra pelo companheirismo e apoio dado durante o mestrado.

A todos os colegas do Serviço de Patologia Clínica que participaram no meu estudo e me ajudaram a concluir o mestrado.

À Professora Doutora Elisabete Ramos e à Doutora Joana pela disponibilidade e ajuda dada no tratamento estatístico.

Ao Diogo, ao Gustavo e à Paula que me ajudaram de diferentes formas no desenvolvimento da tese.

À minha irmã pelo seu apoio constante e pela ajuda preciosa para a conclusão desta tese.

Aos meus pais que me incentivaram, apoiaram e auxiliaram nesta etapa académica.

## palavras-chave

Imunidade inata, recetores toll-like, insuficiência cardíaca, monócitos, subpopulações monocíticas, imunofenótipo.

## Resumo

Os monócitos desempenham um papel importante na imunidade inata e a ativação desta é mediada pelos recetores Toll-like (TLRs). Os TLRs estão envolvidos no reconhecimento de micro-organismos estranhos pelo sistema imunológico inato, podendo também ser ativados por moléculas endógenas. Os TLR2 e TLR4 têm sido associados à ativação da imunidade inata na insuficiência cardíaca (IC).

Os monócitos são populações heterogêneas e compreendem subpopulações com fenótipos distintos, que podem ser identificadas pela diferente expressão dos antígenos CD14 e CD16.

Este estudo tem como objetivo clarificar os mecanismos de ativação da imunidade inata em doentes com insuficiência cardíaca crónica (ICC), utilizando a imunofenotipagem celular por citometria de fluxo.

Foi colhido sangue periférico a 15 doentes com ICC e a 12 controlos saudáveis. Estudou-se por citometria de fluxo o fenótipo celular dos monócitos (FSC, SSC, TLR2, TLR4, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD36, CD45, CD64, HLA-Dr e IREM-2), dos neutrófilos (FSC, SSC, CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16 e CD45) e dos linfócitos (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 e CD56). As três subpopulações monocíticas identificadas ( $CD14^+CD16^-$ ,  $CD14^+CD16^+$  e  $CD14^{dim}CD16^+$ ) apresentaram diferenças fenotípicas dos antígenos celulares estudados. A subpopulação  $CD14^+CD16^+$  foi a que expressou com maior intensidade vários antígenos de ativação e os recetores TLR2 e TLR4. Os doentes com ICC apresentaram um aumento ligeiro da percentagem dos monócitos  $CD14^+CD16^+$  e uma diminuição dos monócitos  $CD14^+CD16^-$ . A subpopulação  $CD14^{dim}CD16^+$  apresentou uma diminuição significativa da sua percentagem com o aumento da gravidade da ICC. Na maioria das subpopulações, o TLR2 e o TLR4 tiveram uma tendência de aumento da sua expressão nos doentes com ICC, do que nos controlos. Os monócitos  $CD14^{dim}CD16^+$  apresentaram uma diminuição significativa da expressão do TLR2 nos doentes com ICC, relativamente ao grupo controlo.

A expressão diferencial do TLR2 e do TLR4 nos subtipos de monócitos poderá contribuir para o desenvolvimento e progressão da IC. A existência de subpopulações monocíticas com fenótipos e funções distintas poderá fornecer informações valiosas da patogénese da IC.

## Keywords

Innate immunity, toll-like receptors, heart failure, monocytes, monocytes subpopulations, immunophenotype

## Abstract

Monocytes play an important role in innate immunity and these are activated by the Toll-like receptors (TLRs). TLRs are able to recognise foreign microorganisms via the innate immune system and these can also be activated by endogenous molecules. TLR2 and TLR4 have been associated with activation the innate immunity in heart failure (HF).

Monocytes are heterogenous populations which are subdivided into distinct phenotypes and can be identified by the different expression of CD14 and CD16 antigens.

This study's main objective is to clarify the activation mechanisms of innate immunity in patients with chronic heart failure (CHF), using the cellular immunophenotyping by flow cytometry.

Peripheral blood was taken from 15 patients with CHF and was used also 12 health controls. The cellular phenotypes of the monocytes were studied using flow cytometry (TLR2, TLR4, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD36, CD45, CD64, HLA-Dr, IREM-2, FSC and SSC), in neutrophils (CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16, CD45, FSC e SSC) and in lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 e CD56).

The three monocytic subpopulations identified (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) revealed phenotypic differences of the cellular antigens. The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation expressed greater intensity of several activation antigens as well TLR2 and TLR4 receptors. Patients with CHF showed a slight increase in monocyte percentage CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and a decrease in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes. The CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation showed a significant decrease of its percentage with increasing severity of CHF. In most subpopulations, TLR2 and TLR4 had a trend of increased expression in patients with CHF than controls. In patients with CHF, CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes showed a significant decrease in expression of TLR2, than the control group.

Different expression of TLR2 and TLR4 in the subtypes of monocytes may contribute to the development and progression of HF.

The existence of monocytic subpopulations with distinct phenotypes and functions can provide valuable information of the pathogenesis of HF.

## Índice

Abreviaturas .....	iv
1. Introdução .....	1
1.1. Imunidade inata.....	3
1.1.1. Recetores “Toll-like” .....	4
1.1.1.1. Vias de sinalização do TLR .....	5
1.1.2. Inflamação .....	7
1.1.3. Modelo de alarme da imunidade inata.....	9
1.2. Insuficiência Cardíaca .....	10
1.3. Imunidade inata na insuficiência cardíaca.....	12
1.3.1. Expressão dos TLR2 e TLR4.....	13
1.4. Caracterização fenotípica dos monócitos.....	14
1.5. Objetivos .....	19
2. Material e Métodos.....	21
2.1. Participantes .....	23
2.2. Obtenção e preparação das amostras .....	23
2.3. Determinação dos parâmetros laboratoriais gerais .....	24
2.4. Expressão do TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo.....	25
2.5. Estudo fenotípico dos monócitos, linfócitos e neutrófilos por citometria de fluxo.....	26
2.6. Estatística.....	28
3. Resultados .....	29
3.1. Caracterização da amostra .....	31
3.2. Análise fenotípica dos leucócitos .....	33
3.3. Análise fenotípica dos monócitos.....	36
3.4. Análise da expressão do TLR2 e TLR4.....	41
3.5. Análise fenotípica dos linfócitos .....	45
3.6. Análise fenotípica dos neutrófilos.....	48
4. Discussão.....	51
5. Conclusão .....	63
6. Referências Bibliográficas .....	67
7. Anexos .....	77

## Índice de figuras

Figura 1 – Vias de sinalização dos diferentes tipos de TLRs. ....	7
Figura 2 – A sinalização dos TLRs promove a inflamação.....	8
Figura 3 – Maturação dos monócitos na medula óssea .....	16
Figura 4 – Parâmetros analíticos nos doentes com ICC, de acordo com a classe funcional NYHA.....	32
Figura 5 – Representação gráfica da identificação dos eventos a serem excluídos da análise.....	33
Figura 6 – Identificação das populações leucocitárias, numa amostra de sangue periférico normal.....	34
Figura 7 – Definição das subpopulações monocíticas (CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> , CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> e CD14 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup> ), no <i>dot-plot</i> CD14 <i>versus</i> CD16.....	36
Figura 8 – Representação gráfica da intensidade de expressão dos marcadores celulares estudados, nas subpopulações monocíticas, comparando um exemplo de um caso típico do grupo controlo, com um caso típico do grupo de doentes com ICC.....	39
Figura 9 – Diagramas de caixa apresentado a IMF dos marcadores celulares nas subpopulações monocíticas, no grupo de doentes e no grupo de controlo. ....	41
Figura 10 – Representação gráfica da intensidade de expressão dos TLR2 e TLR4 nas subpopulações monocíticas, comparando um exemplo de um caso típico do grupo controlo, com um caso típico do grupo de doentes com ICC. .	43
Figura 11 – Diagramas de caixa apresentando a IMF, entre o grupo de doentes e o grupo controlo. ....	44
Figura 12 – Diagramas de caixa apresentando a IMF, entre os grupos: classe de NYHA I e classe de NYHA II/III .....	45
Figura 13 – Análise sequencial para o estudo das populações linfocitárias.....	46
Figura 14 – Análise dos neutrófilos. ....	48



## Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação da Insuficiência Cardíaca da <i>New York Heart Association</i> .....	12
Tabela 2 – Antígenos expressos pelos monócitos com denominação CD (do inglês, <i>cluster of differentiation</i> ).....	15
Tabela 3 – Funções das subpopulações monocíticas.....	18
Tabela 4 – Painel de anticorpos e respectivos fluorocromos utilizados. ....	27
Tabela 5 – Características clínicas dos doentes com ICC. ....	31
Tabela 6 – Análise dos tipos de leucócitos nos participantes do estudo. ....	35
Tabela 7 – Percentagem das subpopulações monocíticas, nos grupos de doentes e controlos. ....	37
Tabela 8 – Percentagem das subpopulações monocíticas nos doentes com ICC, conforme a classe de NYHA. ....	37
Tabela 9 – Análise comparativa das populações linfocitárias. ....	47
Tabela 10 – Análise comparativa dos parâmetros celulares estudados nos neutrófilos.....	49

## Abreviaturas

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ARN** – Ácido ribonucleico

**APC** - Aloficocianina (do inglês: *allophycocyanin*)

**AP1** - Do inglês: *activator protein 1*

**BNP** - Péptido natriurético do tipo B (do inglês: *B-type natriuretic peptide*)

**CD** - Do inglês: *cluster of differentiation*

**CHSJ** - Centro Hospitalar do São João

**DAMPs** - Padrões moleculares associados ao dano (do inglês: *damage-associated molecular patterns*).

**ECM** - Matriz extracelular

**EDTA-K<sub>3</sub>** - Ácido etilenodiaminotetracético-tripotássico

**EPICA** - Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca e Aprendizagem

**FSC** – Do inglês: *Foward Angle Light Scatter*

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: *fluorescein isothiocyanate*)

**HLA** – Antígeno leucocitário humano (do inglês: *human leukocyte antigen*)

**HSP** – Proteína choque térmico (do inglês: *heat shock protein*)

**H7** – Do inglês: *hilite7*

**IC** - Insuficiência cardíaca

**ICC** - Insuficiência cardíaca crônica

**ICA** - Insuficiência cardíaca aguda

**ICAM** - Molécula de adesão intracelular (do inglês: *intracellular adhesion molecule*)

**IgG** - Imunoglobulina G

**IKK** - Do inglês: *inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinases*

**IL** – Interleucina

**IRAKs** - Do inglês: *IL-1 receptor-associated kinases*

**IRF3** - Do inglês: *IFN-regulatory factor 3*

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**LBP** - Proteína de ligação ao LPS

**MyD88** - Do inglês: *myeloid differentiation primary response protein 88*

**MAL/TIRAP** - Do inglês: *adaptador My88-like/TIR domain-containing adaptor protein*

**MAPK** - Do inglês: *mitogen-activated protein kinases*

**MCP** - Proteína quimiotática de monócitos (do inglês: *monocyte chemotactic protein*)

**MMPs** - Metaloproteínases da matriz

**MHC-II** - Complexo major de histocompatibilidade – classe II (do inglês: *major histocompatibility complex- class II*)

**NK** – Do inglês: *Natural killer*

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B (do inglês: *nuclear factor- $\kappa$ B*)

**NYHA** – Do inglês: *New York Heart Association*

**PPRs** - Recetores de reconhecimento de componentes moleculares de padrões clássicos (do inglês: *pattern recognition receptor*)

**PAMPs** – Padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (do inglês: *pathogen-associated molecular patterns*)

**PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5** - Proteína Peridínina Clorofila-Cianina<sup>TM</sup>5.5 (do inglês: *peridinin chlorophyll protein-cyanin<sup>TM</sup>5.5*)

**PE** - Ficoeritrina (do inglês: *phycoerythrin*)

**PC7** - Ficoeritrina cianina 7 (do inglês: *phycoerythrin cyanin 7*)

**ROS** - Espécies reativas de oxigénio (do inglês: *reactive oxygen species*)

**RIP1** - Do inglês: *receptor-interacting protein 1*

**SSC** – Do inglês: *Side Angle Light Scatter*

**SPSS** – Do inglês: *Statistical Package for Social Sciences*

**TLRs** - Recetores "Toll-like" (do inglês: *Toll-like receptors*)

**TIR** - Do inglês: *Toll/IL-1 Receptor*

**TRIF** - Do inglês: *TIR-domain-containing adaptor inducing interferon b*

**TRAM** - Do inglês: *TRIF-related adaptor molecule*

**TAK1** - Do inglês: *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*

**TRAF6** - Do inglês: *tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6*

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$

**TA** - Temperatura ambiente

**VIH** - Vírus da imunodeficiência humana

**VCAM** - Molécula de adesão celular vascular (do inglês: *vascular cell adhesion molecule*)

# **1. Introdução**



## **1. Introdução**

O sistema imunológico compreende todos os mecanismos de defesa que um organismo dispõe para se proteger de micro-organismos ou de macromoléculas (proteínas ou polissacarídeos) que lhe sejam estranhos. Este sistema divide-se em dois tipos de respostas inter-relacionadas e funcionalmente definidas: a resposta imunológica inata com uma especificidade de largo espectro e a resposta imunológica adaptativa com especificidade restrita (1,2).

### **1.1. Imunidade inata**

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do nosso organismo contra infeções e a sua ativação estimula a resposta imunológica adaptativa (1,3). Enquanto a imunidade adaptativa assenta em respostas antigénio-específicas com potencial para a memória imunológica, a resposta imunológica inata é imediata e similar contra uma grande variedade de agentes patogénicos, não possuindo memória imunológica. Este tipo de imunidade caracteriza-se pela sua curta duração, não requerendo uma exposição prévia ao agente infeccioso, nem se alterando mediante exposição imunológica repetida ao mesmo agente infeccioso (2,3).

Os primeiros mecanismos de defesa inata do hospedeiro consistem num conjunto de barreiras físicas e químicas, representadas pela pele e mucosas e pelas substâncias antimicrobianas produzidas nesses locais. Havendo passagem do micro-organismo através destas barreiras, inicia-se um conjunto de eventos com o objetivo de eliminar o micro-organismo invasor. Assim, a maioria das ações da resposta imunológica compreendem a fagocitose, mediada pelo complemento, de agentes patogénicos, a produção de mediadores e citocinas para recrutar novas células fagocíticas, a secreção de interferão com a finalidade de induzir respostas no hospedeiro e a ativação das células “natural killer” (NK) (1,2,4).

Para impedir a entrada de micro-organismos infecciosos, o sistema imunológico inato desenvolveu uma série de recetores de reconhecimento de

componentes moleculares de padrões clássicos (PPRs, do inglês *pattern recognition receptors*) que têm a capacidade de reconhecer estruturas moleculares conservadas e produzidas pelos agentes patogénicos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), nomeadamente lípidos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos. Os PAMPs são partilhados por grupos de agentes patogénicos, mas ao mesmo tempo não estão presentes no hospedeiro, permitindo ao sistema imunológico inato distinguir moléculas próprias de estruturas não específicas associadas aos mesmos (5,6) [Exemplos típicos de PAMPs no anexo 1].

#### 1.1.1. Recetores “Toll-like”

Os recetores “Toll-like” (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) são um exemplo de PPRs e compreendem uma família de recetores de proteínas presentes nas células fagocíticas (neutrófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos), bem como por outros tipos de células (células epiteliais, fibroblastos, etc.) (7,8). Estes recetores são o principal mecanismo pelo qual o hospedeiro, reconhecendo os seus PAMPs, deteta que há um microinvasor presente. Nos mamíferos, os recetores “Toll-like” são homólogos dos recetores “Toll” da *Drosophila*, tendo sido identificados 13 tipos de TLRs que reconhecem PAMPs distintos. Estes recetores dividem-se em dois grupos de recetores de membrana: os TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10, 12, 13 e os TLRs 3, 7, 8, 9 localizados, respetivamente, na membrana da superfície celular e na membrana endossómica (1,9).

Os TLRs ativados vão controlar a iniciação, manutenção e finalização da defesa inata do hospedeiro. A ativação do TLR induz a produção de citocinas próinflamatórias (fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1) e a IL-6) e moléculas antimicrobianas, que ativam componentes da imunidade celular. Estes também induzem a expressão de moléculas coestimuladoras nas células dendríticas, essenciais para a ativação da resposta imunológica adaptativa (9,12,14).

Os TLRs são proteínas transmembranares que contém domínios extracelulares compostos por regiões ricas em leucina, que interagem com os



PAMPs e uma porção intracelular com um domínio TIR (do inglês *Toll/IL-1 Receptor*), que é um módulo conservado de sinalização intracelular (1,10).

#### **1.1.1.1. Vias de sinalização do TLR**

Os diferentes tipos de TLRs reagem com PAMPs específicos, ativando assim vias de sinalização específicas e conduzindo a respostas antimicrobianas distintas (11,12). A via de sinalização que é utilizada depende em grande parte de moléculas adaptadoras citoplasmáticas que estão presentes para se associarem ao domínio intracitoplasmático do TLR. A MyD88 (do inglês *myeloid differentiation primary response protein 88*) é a molécula adaptadora mais utilizada pelos TLRs, podendo-se associar a todos os tipos de TLR, exceto ao TLR3. Outras moléculas adaptadoras utilizadas na cascata de sinalização do TLR incluem a MAL/TIRAP (do inglês *adaptador My88-like/TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (do inglês *TIR-domain-containing adaptor inducing interferon b*) e a TRAM (do inglês *TRIF-related adaptor molecule*) (1,13,14). A existência de diferentes tipos de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR revelou diferenças nas vias de transdução do sinal de cada um dos TLRs (12).

A ligação de um PAMP ao respetivo TLR provoca uma alteração conformacional deste, iniciando uma cascata de sinalização intracelular, culminando no desenvolvimento de uma resposta imunológica (1).

As vias de sinalização dos TLRs podem ser divididas em dependentes da MyD88 e independentes da MyD88 (figura 1) (9).

#### **Via dependente da MYD88**

Todos os TLRs até agora caracterizados, com a exceção do TLR3, utilizam a via dependente da proteína adaptadora MyD88. A via dependente da MyD88 através dos TLRs 1, 2, 4 e 6 requer ainda a proteína adaptadora TIRAP para iniciar o processo de sinalização. A estimulação do TLR por um ligando recruta a MyD88 até ao recetor através do seu domínio TIR, que interage com o domínio TIR do TLR. Esta ligação provoca o recrutamento sequencial da

família de quinases, as IRAKs (do inglês *IL-1 receptor-associated kinases*) 4, 1 e 2. A fosforilação da IRAK1 pela IRAK4 resulta no recrutamento da TRAF6 (do inglês *tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6*), resultando em duas vias de sinalização: uma leva à ativação dos fatores de transcrição AP1 (do inglês *activator protein 1*) através da ativação do MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinases*); a outra ativa o TAK1 (do inglês *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) potenciando a atividade do complexo IKK (do inglês *inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinases*), que quando ativado induz a fosforilação e degradação subsequente de I $\kappa$ B ocorrendo a formação do NF- $\kappa$ B (do inglês *nuclear factor- $\kappa$ B*). O NF- $\kappa$ B desloca-se do citoplasma para o núcleo da célula e aí induz a transcrição de diferentes genes requeridos para a resposta inflamatória (9,14,15).

#### Via independente da MyD88

Esta via envolve as moléculas adaptadoras TRIF ou TRAM. Os TLR3 e TLR4 iniciam a via dependente de TRIF para induzir a produção de citocinas e interferão tipo I. A via dependente de TRIF ativa o NF- $\kappa$ B através de duas vias independentes: numa delas o domínio terminal N da TRIF interage com a TRAF6; na outra via, através do domínio terminal C da TRIF interage com RIP1 (do inglês *receptor-interacting protein 1*) e ativa a TAK1. A via dependente da TRIF também induz a síntese do interferão  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) através do IRF3 (do inglês *IFN-regulatory factor 3*). O IRF3 é fosforilado e ativado pelas quinases IKK - TBK1 e IKKi - levando à produção de interferões e moléculas coestimulatórias. A TRAF3 atua como uma ponte entre a TRIF e TBK1 (9,14,15).

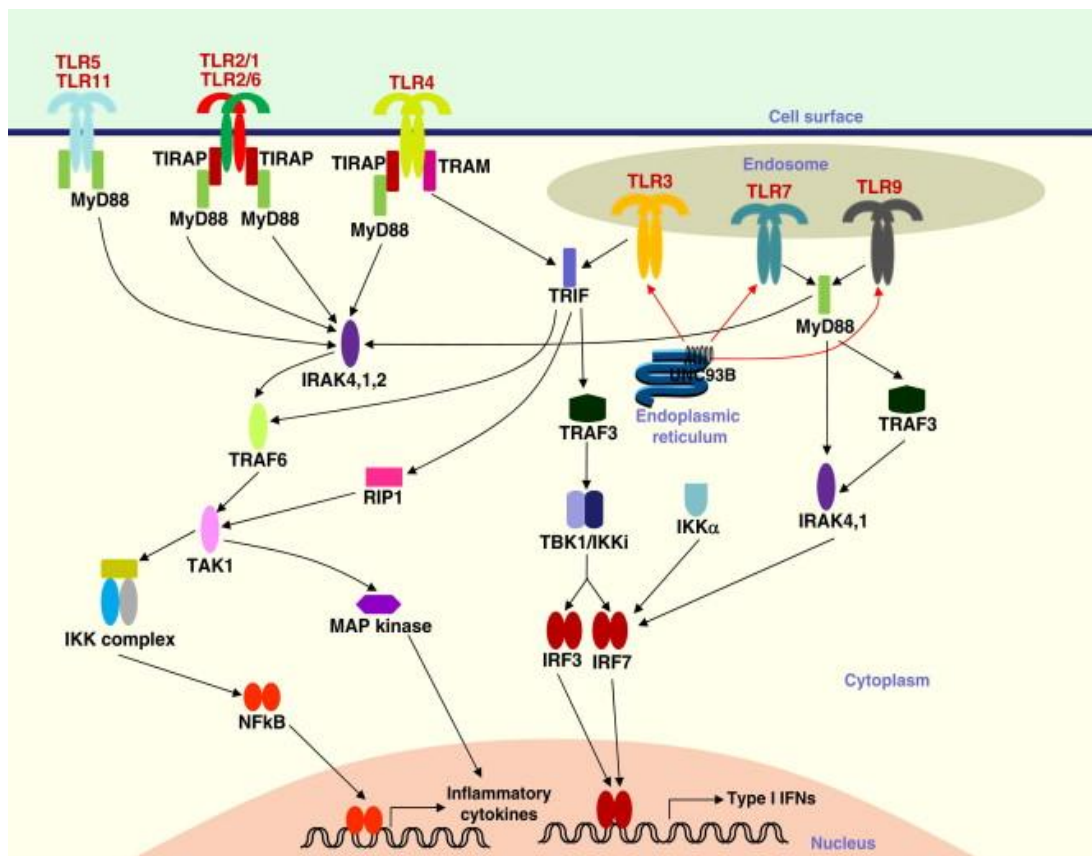


Figura 1 – Vias de sinalização dos diferentes tipos de TLRs. Figura adaptada de Kumar *et al.*, (15).

### 1.1.2. Inflamação

A principal função dos TLRs consiste na iniciação da resposta imunológica inata e a inflamação é o ponto chave desta resposta. A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo contra agressões e propicia a acumulação e a ativação de células fagocíticas no local da lesão, o que contribui para a eliminação do agente inflamatório. É também essencial para a reparação dos tecidos e para o estabelecimento da imunidade específica (3,13).

Os principais tipos de células fagocíticas são os neutrófilos, monócitos e macrófagos. Os primeiros circulam no sangue periférico, mas a maior parte (cerca de 90%) encontra-se marginada ao longo do revestimento endotelial dos vasos. Os monócitos correspondem a 5-10% dos leucócitos que circulam no sangue periférico onde permanecem entre 1 a 3 dias. Numa fase posterior

The diagram illustrates the inflammatory response to a wound. Bacteria enter through a wound, triggering phagocytosis by a neutrophil. The process involves TLRs (TLR1/2, TLR4), MyD88, IKK complex, NF-κB, and TRAM/IR3MyD88. This leads to the production of reactive oxygen species ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ), antimicrobial peptides, and proinflammatory cytokines (TNF, IL-1, IL-6). The cytokines cause systemic effects like vasodilation, fever, and altered metabolism. The diagram also shows the role of leukotrienes and a cytokine receptor in the response.

8

Os macrófagos para além de produzirem citocinas, fagocitam e destroem os micro-organismos estranhos e removem os restos celulares e resíduos provenientes de tecidos lesados, sendo essenciais para a reparação tecidual. Como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos processam e apresentam os antígenos aos linfócitos T, com a finalidade de ativar uma resposta imunológica adaptativa apropriada. Após a fagocitose, há um aumento do consumo de oxigénio e ativação de enzimas que promovem a produção de compostos de oxigénio reativos, vários intermediários e os radicais livres que medeiam a destruição dos micro-organismos invasores (13).

Em alguns casos o processo inflamatório agudo não é completamente resolvido, levando a uma inflamação crónica. A causa básica da inflamação crónica é a persistência do fator etiológico, seja o agente infeccioso ou então restos de micro-organismos, corpos estranhos ou produtos de metabolismo. Este tipo de inflamação acontece quando os macrófagos e os linfócitos T são constantemente ativados, levando à sua acumulação nos sítios da inflamação, provocando uma lesão tecidual. As citocinas, libertadas pelos macrófagos cronicamente ativados, estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colagénio que culmina na fibrose, característica das inflamações crónicas (3).

### **1.1.3. Modelo de alarme da imunidade inata**

Estudos recentes sugerem que o sistema imunológico inato reconhece sinais de “perigo” endógenos, designados por padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*). O modelo de alarme da imunidade sugerido por Matzinger, propõe que a presença de PAMPs não ativa necessariamente uma resposta imunológica a não ser que exista uma lesão tecidual no hospedeiro (9,14,19). Este modelo defende que o sistema imunológico é ativado por sinais de “dano” ou “alarme” endógenos originados por células mortas, danificadas ou sujeitas a stress, que são reconhecidos pelos TLRs da imunidade inata, mesmo na ausência de uma infeção (20,21).

Os DAMPs correspondem a mudanças nas porções lipídicas, glucídicas

que se expressam na superfície celular, ou ainda pela presença de proteínas normalmente inexistentes na membrana celular externa (19). Como exemplos destas moléculas (anexo 1), referem-se o ácido úrico cristalino, as proteínas de choque térmico 60, 70 e 96 (produtos de células sujeitas a stress), os fragmentos de ácido hialurónico e a fibronectina (produtos de lesão tecidual) (20,22,23).

O reconhecimento e ativação dos TLRs por moléculas derivadas de uma lesão tecidual podem ser uma importante explicação para a compreensão da relação entre a imunidade inata e as doenças cardiovasculares. Trabalhos recentes indicam que os TLRs têm um papel importante no desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca (9,24).

## **1.2. Insuficiência Cardíaca**

A insuficiência cardíaca (IC) é um dos principais problemas de saúde pública para a maioria dos países desenvolvidos, tendo um grande impacto socioeconómico, relacionado sobretudo com os gastos em hospitalização, medicação e meios de intervenção, mas também, por estarem implícitas consequências indiretas, como a redução da qualidade de vida e a perda de produtividade (25,26).

O envelhecimento das populações e o prolongamento da esperança média de vida dos doentes cardíacos pelas modernas inovações terapêuticas levou a um aumento da prevalência de IC (27,28). De acordo com o estudo português Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca e Aprendizagem (EPICA) (29), a prevalência de IC é de 4,36%. Neste estudo, a prevalência de IC aumenta abruptamente com a idade, sendo 1,36% em indivíduos com idades compreendidas entre os 25-49 anos e atingindo os 16,14% em indivíduos com mais de 80 anos.

Apesar da melhoria na terapêutica, a taxa de mortalidade em doentes com IC permanece elevada, excedendo 50% aos 5 anos (27,30). Segundo estudos europeus, 40% dos doentes internados no hospital com IC morrem ou são readmitidos ao fim de 1 ano (28).

A IC é uma patologia que ocorre em indivíduos que, devido a alguma anomalia, herdada ou adquirida, na estrutura e/ou função cardíaca, prejudica o funcionamento fisiológico do coração enquanto suporte da circulação (31,32).

Segundo as normas de orientação da Sociedade Europeia de Cardiologia de 2012 (31) a IC é definida, a nível clínico, como uma síndrome que ocorre em indivíduos com sintomas típicos de IC (como por exemplo, dispneia, edema dos tornozelos, fadiga) e sinais resultantes de uma anomalia da estrutura ou da função cardíaca (aumento da pressão venosa jugular, crepitações pulmonares, alteração do batimento cardíaco no apex).

A doença arterial coronária é a causa mais frequente subjacente à IC, afetando cerca de dois terços dos doentes com esta patologia. Os restantes não têm uma causa isquémica de disfunção cardíaca, podendo ter uma causa identificada (por exemplo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, doença valvular, toxinas do miocárdio, ou miocardite) ou não ter nenhuma causa discernível (por exemplo, cardiomiopatia dilatada idiopática) (33,34).

A insuficiência cardíaca crónica (ICC) é um estado patológico progressivo, com sintomas clínicos persistentes. Embora menos comum do que a ICC, os doentes podem desenvolver insuficiência cardíaca aguda (ICA). Esta é definida como um início rápido ou uma mudança clínica dos sinais e sintomas de IC, resultando numa necessidade urgente de tratamento. A ICA pode ser um acontecimento inicial e súbito de insuficiência ou uma descompensação de ICC (35).

A *New York Heart Association* (NYHA) classificou a IC em 4 classes de acordo com a intensidade dos sintomas e a capacidade física dos doentes (tabela 1). Esta classificação além de possuir um carácter funcional, é também uma maneira de avaliar a qualidade de vida do doente relativamente à sua doença (28,32).

Tabela 1 – Classificação da Insuficiência Cardíaca da *New York Heart Association*.

<b>Classe I</b>	Nenhuma limitação da atividade física. As atividades físicas quotidianas não causam fadiga, palpitações ou dispneia.
<b>Classe II</b>	Limitação ligeira da atividade física. Assintomático em repouso, mas as atividades físicas quotidianas causam fadiga, palpitações ou dispneia.
<b>Classe III</b>	Limitação acentuada da atividade física. Assintomático em repouso, mas sintomático para pequenos esforços.
<b>Classe IV</b>	Sintomático em repouso com agravamento dos sintomas para o mínimo esforço.

Tabela adaptada e traduzida de Dickstein *et al.*, (28).

### 1.3. Imunidade inata na insuficiência cardíaca

Na última década, o papel do sistema imunológico inato em muitos processos fisiopatológicos do coração tem suscitado uma considerável atenção pela comunidade científica (14,36).

O tecido miocárdico dos mamíferos possui um sistema imunológico inato funcional. Em resposta a diferentes formas de lesão tecidual, os miócitos cardíacos desencadeiam uma resposta imunológica inata pela produção de mediadores e efetores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, e quimocinas, com a finalidade de preservar a homeostasia cardíaca (5,6,22).

Os TLRs além de serem expressos nas células imunológicas são também expressos noutros tecidos, nomeadamente ao nível do sistema cardiovascular, podendo funcionar como uma ligação importante entre o desenvolvimento de doença cardiovascular e o sistema imunológico. A acrescentar a esse facto, existe a evidência de que a ativação dos TLRs contribui para o desenvolvimento e progressão da arteriosclerose, da disfunção cardíaca na sepsis, na diminuição da contractilidade e na IC (22).

Vários estudos efetuados em humanos e animais com IC concluíram que o sistema imunológico se encontrava ativado, apesar de não existir evidência de um agente patogénico na sua etiologia. A ativação deste sistema estava associada à progressão desfavorável da IC (19,36). A ativação dos TLRs a



curto prazo conferiu uma resposta protetora ao coração. Por outro lado, a sua ativação prolongada resultou na produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão celular, que levaram ao recrutamento de neutrófilos, monócitos e células dendríticas para o miocárdio, aumentando a morte celular e resultando numa reparação cardíaca adversa (20,37).

### **1.3.1. Expressão dos TLR2 e TLR4**

Vários estudos realizados constataram que nos doentes com enfarte do miocárdio, a sinalização do TLR se encontrava ativada e havia um aumento da produção de citocinas. A expressão do TLR4 em monócitos periféricos encontrava-se também aumentada, estando relacionada com a gravidade da patologia (38,39). Frantz *et al.* (9) observaram que o mesmo acontecia em humanos e animais com IC e que o padrão de expressão do TLR4 se encontrava alterado. Assim, em doentes com IC o tecido miocárdico apresentava uma intensa expressão de TLR4 em determinadas áreas focais, contrastando com o tecido miocárdico normal cujo padrão de expressão do TLR4 era difuso, indicando assim um maior recrutamento de monócitos para áreas do miocárdio em processo de remodelação (9,14,20,39).

Outras investigações estudaram o papel do TLR4 na lesão de reperfusão miocárdica, nas quais constataram que a administração de pequenas doses de LPS (lipopolissacarídeo) ou monofosforil lipídico A (derivado da parede celular bacteriana de bactérias Gram-negativas) protegeu o miocárdio contra posterior isquemia e lesão de reperfusão. Porém, a administração de LPS em altas doses provocou uma diminuição da função miocárdica e este efeito foi dependente da sinalização mediada pelo TLR4 (14,20).

Para compreender o papel do TLR4 no enfarte do miocárdio e na inflamação após um período de isquemia-reperfusão, Oyama *et al.* (41) utilizaram ratos deficientes em TLR4 e verificaram que estes, em comparação com ratos normais, tiveram enfartes em menor grau e uma atenuação da inflamação relacionada com a lesão. Similarmente, ratos pré-tratados com um antagonista de TLR4 (Eritoran) sofreram enfartes com menor extensão e de uma diminuição da resposta inflamatória, do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e da expressão de mediadores inflamatórios, quando comparados com ratos

normais (40). Estes estudos concluíram assim que o TLR4 estava envolvido na resposta inflamatória a uma lesão tecidual isquêmica (40,41).

O potencial papel do TLR2 na resposta ao stress oxidativo foi demonstrado em miócitos cardíacos de ratos recém-nascidos. O bloqueio da função do TLR2 inibiu a produção de peróxido de hidrogénio induzida pelo NF- $\kappa$ B e diminuiu os seus efeitos tóxicos (14,19).

No sentido de esclarecer o papel do TLR2 na remodelação ventricular após um enfarte do miocárdio, Shishido *et al.* (42) observaram que os ratos deficientes para o TLR2 apresentaram um aumento da taxa de sobrevivência e a função cardíaca estava mais preservada do que os ratos normais. Verificaram também uma atenuação da fibrose miocárdica nas áreas não afetadas pelo enfarte, através da diminuição da expressão do fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 e do colagénio, ambos envolvidos neste tipo de fibrose. Este estudo comprovou que a remodelação ventricular após enfarte do miocárdio ocorreu através da via de sinalização dependente do TLR2 (42).

#### **1.4. Caracterização fenotípica dos monócitos**

Os monócitos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear que, juntamente com os macrófagos, desempenham um papel importante na defesa imunológica, na inflamação e na remodelação tecidual, através da sua capacidade para o processamento e apresentação de antígenos, fagocitose de agentes patogénicos e produção de citocinas (18,39,43).

Os monócitos possuem na sua superfície celular recetores que podem ser caracterizados pela ligação a anticorpos monoclonais específicos, através da técnica de citometria de fluxo. Estes recetores são marcadores da sua linhagem, crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, migração e da sua função (8). Os antígenos expressos pelos monócitos encontram-se sumariados na tabela 2.

Tabela 2 – Antígenos expressos pelos monócitos com denominação CD (do inglês, *cluster of differentiation*).

Molécula CD	Expressão celular	Função
<b>CD4</b>	Linfócitos T auxiliares, monócitos, macrófagos e subpopulação de tímócitos	Ativação dos linfócitos T, diferenciação tímica, recetor do VIH
<b>CD11b</b>	Monócitos, macrófagos, granulócitos, células NK e células dendríticas	Adesão, quimiotaxia, apoptose
<b>CD14</b>	Monócitos, macrófagos e células Langerhans	Recetor para o complexo de LPS e LBP, resposta imunológica inata
<b>CD16</b>	Granulócitos, macrófagos, monócitos e células NK	Transdução do sinal, ativação das células NK e citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>CD36</b>	Monócitos, macrófagos, plaquetas, precursores eritroides e células endoteliais.	Recetor <i>scavenger</i> , adesão e fagocitose
<b>CD45</b>	Leucócitos	Ativação e sinalização
<b>CD64</b>	Monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos ativados	Recetor de alta afinidade para a IgG, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e captura de antígenos
<b>HLA-Dr</b>	Linfócitos B, monócitos, macrófagos, linfócitos T ativados, células NK ativadas e células progenitoras	Reconhece o MHC-II e apresenta antígenos peptídicos aos linfócitos T auxiliares
<b>IREM-2</b>	Monócitos e células dendríticas mieloides	Recetor de ativação através da interação com a DAP12

Abreviaturas: IgG, imunoglobulina G; LBP, proteína de ligação ao LPS; LPS, lipopolissacarídeo; MHC-II, complexo major de histocompatibilidade – classe II; VIH, vírus da imunodeficiência humana; Tabela adaptada e traduzida de O’Gorman & Donnenberg, (8).

Os monócitos são produzidos na medula óssea a partir de um progenitor mielóide comum (16). A maturação da linhagem monocítica processa-se em três estádios baseados na expressão de antígenos na sua superfície celular (figura 3). O primeiro estádio (monoblasto) é identificado pela expressão intermédia de CD45, pela expressão de CD34 e CD117. Neste estádio também começam a ser expressos o CD64, CD36 (baixa expressão) e HLA-Dr,

mantendo-se este durante a restante maturação dos monócitos. A progressão de monoblasto para promonócito é marcada pelo desaparecimento de CD34 – que perde a expressão ainda como monoblasto – mantendo as células níveis intermédios de CD45. Este estadio é ainda caracterizado pela expressão alta de CD64, intermédia de CD36, pelo início de expressão de CD11b e pela ausência ou baixa expressão de CD14. O aumento da expressão do CD45 e do CD14, e o aparecimento de IREM-2 identificam o estadio de monócito (44,45).

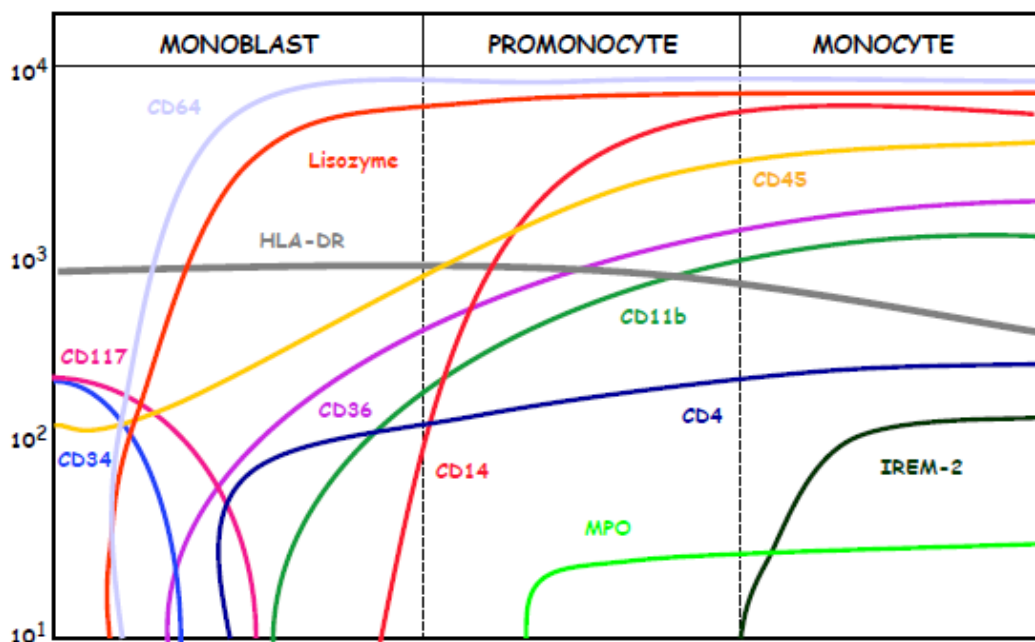


Figura 3 – Maturação dos monócitos na medula óssea. Figura adaptada e acedida do grupo de Orfão, (46).

Numerosos trabalhos efetuados verificaram que os monócitos são uma população heterogénea. A identificação de uma grande variedade de marcadores celulares e das suas funções permitiram a distinção fenotípica e funcional de subconjuntos monocíticos (16,39).

Nos últimos 25 anos, estudos realizados nos monócitos humanos observaram que estes podiam ser agrupados em 2 subconjuntos de acordo com a expressão de dois antígenos: o CD14 (faz parte do recetor para o LPS) e o CD16 (recetor FcγIII). O subconjunto dominante representava 85% dos monócitos e expressava fortemente o CD14 (CD14<sup>+</sup>), sendo negativo para o CD16 (CD16<sup>-</sup>), enquanto o subconjunto minoritário expressava o CD14 mais fracamente (CD14<sup>dim</sup>) mas possuía uma alta expressão de CD16 (CD16<sup>+</sup>) (47,48). Os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> foram designados de “clássicos”, porque o

fenótipo apresentado correspondia à sua descrição original, ao passo que a subpopulação monocítica  $CD14^{dim}CD16^+$  foi designada como “não clássica” ou “pró-inflamatória” (16).

Estudos funcionais realizados nas subpopulações monocíticas verificaram que os monócitos  $CD14^+CD16^-$  expressavam altos níveis do recetor de quimiocina CCR2, baixos níveis de CX3CR1 e produziam ROS. Contrastando com este subconjunto, os monócitos  $CD16^+$  expressavam níveis elevados de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2, não produziam ROS e possuíam uma menor capacidade fagocitária que os monócitos  $CD14^+CD16^-$  (49-51).

Um novo subconjunto de monócitos foi posteriormente encontrado em investigações, nas quais constataram que os monócitos  $CD16^+$  podiam ser divididos em duas populações com funções distintas, de acordo com a expressão diferencial de CD14: uma população (5% dos monócitos) com uma intensidade elevada de expressão de CD14 ( $CD14^+CD16^+$ ), designada de intermédia e uma outra população (10% dos monócitos) com uma expressão mais fraca de CD14 ( $CD14^{dim}CD16^+$ ), que foi designada de não-clássica (17,49,51,52). Os monócitos  $CD14^+CD16^+$  expressavam os recetores Fc  $CD64$  e  $CD32$  e possuíam atividade fagocitária. Já os monócitos  $CD14^{dim}CD16^+$  não expressavam os recetores de Fc e a capacidade fagocitária era fraca (17,18,49). Esta subpopulação foi encontrada expandida em respostas inflamatórias e infecciosas, como na sepsis, na infeção pelo vírus de imunodeficiência humana e na tuberculose (17,53). Por sua vez, os monócitos  $CD14^+CD16^+$  também estavam aumentados em recém-nascidos com sepsis, na arteriosclerose, na artrite reumatoide e na asma grave (17,54).

Na tabela 3 encontram-se representadas as subpopulações monocíticas e as suas funções.

Tabela 3 – Funções das subpopulações monocíticas.

	<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup></b>	<b>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup></b>	<b>CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup></b>
<b>Função</b>	Fagocitose, remoção de restos celulares, libertação de MMPs para a remodelação da ECM, produção de citocinas, libertação de ROS	Angiogénese, produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10)	Deposição de colagénio, reparação, efeitos anti-inflamatórios
<b>Atividade fagocitária</b>	Alta	Alta	Baixa
<b>Produção de citocinas estimulada pelo LPS</b>	Produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1	Produção semelhante de TNF- $\alpha$ aos monócitos CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> Produção aumentada de IL-10	Sem efeitos na produção de citocinas pró-inflamatórias Produção baixa de IL-10
<b>Moléculas de adesão</b>	Expressão intermédia de ICAM-1 e VCAM-1	Alta expressão do recetor ICAM-1, de moléculas de adesão e aumento da aderência endotelial do monócito	Alta expressão do recetor VCAM-1
<b>Recetores de quimocinas</b>	Mobilização (via recetor CCR2) ao ligando MCP-1	Mobilização (via CX3CR1) ao fractalkine	Informação não disponível

Abreviaturas: ECM, matriz extracelular; ICAM, molécula de adesão intracelular; IL, interleucina; LPS, lipopolissacarídeo; MCP, proteína quimiotática de monócitos; MMPs, metaloproteínases da matriz; ROS, espécies reativas de oxigénio; TNF, fator de necrose tumoral; VCAM, molécula de adesão celular vascular; Tabela adaptada e traduzida de Wrigley *et al.*, (39).

### **1.5. Objetivos**

Este estudo tem como principal objetivo contribuir para uma melhor caracterização dos mecanismos de ativação da imunidade inata em doentes com insuficiência cardíaca crónica, utilizando a imunofenotipagem celular por citometria de fluxo. Neste contexto, os objetivos específicos desta dissertação consistem na:

- Observação da expressão dos TLR2 e TLR4 nos monócitos de doentes com IC;
- Caracterização imunofenotípica das subpopulações monocíticas do sangue periférico;
- Caracterização imunofenotípica dos linfócitos e neutrófilos do sangue periférico;

O cumprimento destes objetivos poderá contribuir para esclarecer o papel da ativação da imunidade inata na insuficiência cardíaca, o que se reveste de grande importância para a compreensão da sua fisiopatologia e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes.





## **2. Material e Métodos**



## 2.1. Participantes

Foram selecionados 15 doentes com ICC (9 do sexo masculino e 6 do sexo feminino), com idades compreendidas entre os 50 e os 91 anos, que se encontravam a ser seguidos na consulta do Centro Hospitalar do São João (CHSJ) entre outubro e novembro de 2012. Como critérios de inclusão deste estudo, os doentes possuíam uma disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, encontravam-se clinicamente estáveis e a terapêutica médica otimizada pelo menos há 3 meses. Os doentes que tivessem sido internados nos últimos 2 meses e que apresentassem a função do ventrículo esquerdo normal foram excluídos do estudo.

Foi constituído um grupo controlo com 12 dadores de sangue (6 do sexo masculino e 6 do sexo feminino), com idades compreendidas entre 17 e 42 anos, aparentemente saudáveis, sem histórico de doenças cardiovasculares.

Aquando da inclusão no estudo dos doentes e do grupo controlo foram registados os seguintes parâmetros: sexo, idade, classe de NYHA (classe I – IV), existência de diabetes e de hipertensão, e a medicação. Por citometria de fluxo, estudou-se o imunofenótipo dos monócitos (FSC, SSC, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD36, CD45, CD64, HLA-Dr, IREM-2, TLR2 e TLR4), dos neutrófilos (FSC, SSC, CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16 e CD45) e dos linfócitos (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 e CD56). Determinou-se a proteína C reativa (PCR), a hemoglobina (HBG) e o número de leucócitos. No grupo de doentes procedeu-se ainda, à determinação do péptido natriurético do tipo B (BNP, do inglês *B-type natriuretic peptide*) e da creatinina.

O estudo em questão não possui qualquer tipo de obstáculo de índole ética, dado que se encontra de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsínquia e foi aprovado pela comissão de ética do CHSJ.

## 2.2. Obtenção e preparação das amostras

De cada participante foram colhidas amostras de sangue periférico por punção venosa. Para a análise por citometria de fluxo e para a determinação dos parâmetros hematológicos, foi colhido sangue para um tubo contendo o ácido etilenodiaminotetracético-tripotássico (EDTA-K<sub>3</sub>) como anticoagulante.

Num tubo com gel Z (ativador da coagulação) colheu-se sangue para o doseamento da creatinina e da PCR, a fim de se obter soro, após centrifugação a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Para a determinação do BNP foi colhido sangue para um tubo contendo heparina lítio, para obtenção de plasma após centrifugação a 3500rpm durante 10 minutos. As amostras foram processadas num período inferior a 24 horas.

### **2.3. Determinação dos parâmetros laboratoriais gerais**

Os parâmetros hematológicos (HGB e leucócitos) foram determinados no analisador de Hematologia automático Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), após ter sido efetuado o controlo de qualidade diário.

A HGB foi analisada pelo detetor de HGB com base no método de deteção de hemoglobina SLS (Lauril sulfato de sódio). Os valores de referência da HGB utilizados pelo laboratório são: 13,0 a 17,0 g/dl para o sexo masculino (acima dos 13 anos) e 12,0 a 15,0 g/dl para o sexo feminino (acima dos 13 anos).

Os leucócitos foram analisados pelo bloco de deteção ótico com base no método de citometria de fluxo, utilizando um laser semiconductor. Os valores compreendidos entre  $4,0$  e  $11,0 \times 10^9/L$  são considerados normais.

A determinação quantitativa da creatinina sérica foi realizada utilizando o kit Creatinine (Beckman Coulter, Brea, California, USA). Foi efetuado um ensaio de cor cinético (método Jaffé), no autoanalisador Olympus AU5400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg). A avaliação da creatinina foi efetuada após a realização do controlo de qualidade diário. Os valores de referência utilizados pelo laboratório são: 0,8 a 1,4 mg/dl para o sexo masculino e 0,6 a 1,1 mg/dl para o sexo feminino.

A PCR foi doseada no soro utilizando o kit CRP Latex (Beckman Coulter, Brea, California, USA), que se baseia num ensaio imuno-turbidimétrico. A sua determinação quantitativa foi efetuada no autoanalisador Olympus AU5400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg). A análise da PCR foi realizada após o

controle de qualidade diário do laboratório. Os valores inferiores a <3mg/L são considerados normais.

O BNP foi quantificado no plasma utilizando o kit de diagnóstico – ARCHITECT BNP Reagent Kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), no equipamento ARCHITECT PLUS i2000sr (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). A determinação da concentração do BNP baseou-se num imunoensaio de micropartículas por quimioluminiscência (CMIA), sendo efetuada após a realização do controlo de qualidade diário. Os valores de referência utilizados pelo laboratório são: <100 pg/mol.

#### **2.4. Expressão do TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo**

Para a análise da expressão do TLR2 e TLR4 utilizaram-se os seguintes anticorpos monoclonais: TLR2-Alexa Fluor® 488 (clone 11G7, BD Pharmingen™, San Diego, California, USA); TLR4 biotinilado (Biotin Mouse Anti-Human Toll-Like Receptor 4, clone HTA125, BD Pharmingen™, San Diego, California, USA) com a utilização para marcação fluorescente de Estreptavidina-Proteína Peridina Clorofila-Cianina™5.5 (PerCP-Cy™5.5, BD Pharmingen™, San Diego, California, USA); CD14-Aloficocianina (APC, clone MφP9, BD Biosciences, San Jose, California, USA), CD16-Ficoeritrina (PE, clone 3G8, Immunotech®, Marseille, France) e CD45-Pacific Orange (clone HI30, Invitrogen™, Frederick, USA).

A preparação das amostras iniciou-se pela adição a 100 µl de sangue de 20 µl do anticorpo monoclonal TLR4, seguido de incubação de 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente (TA). Procedeu-se a um passo de lavagem, adicionando 3 ml de solução de lavagem (BD FACSToP™, BD Biosciences, San Jose, California, USA) e centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 20 µl de Estreptavidina-PerCP-Cy™5.5. Após nova incubação de 15 minutos no escuro e à TA, procedeu-se a uma lavagem igual à anteriormente realizada. Adicionaram-se os restantes anticorpos monoclonais com marcação direta (TLR2-Alexa Fluor® 488, CD45-Pacific Orange, CD16-PE e CD14-APC) e incubou-se 15 minutos nas mesmas condições anteriores. Adicionou-se 2 ml de solução de lise (FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose, California, USA) para a lise dos eritrócitos

e voltou a incubar-se durante 15 minutos no escuro e à TA. As células foram posteriormente centrifugadas, a 1500 rpm durante 5 minutos. Após a rejeição do sobrenadante, adicionou-se 3 ml da solução de lavagem e centrifugou-se novamente. Por fim, as amostras foram suspensas em 0,5ml de BD FACSTlow™.

A aquisição das amostras foi realizada no citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II da Becton Dickinson®, equipado com três lasers: um laser azul (488nm), um laser vermelho (633nm) e um laser violeta (405nm), podendo ler até 8 fluorescências. A aquisição foi efetuada após o controlo de qualidade diário com esferas fluorescentes de configuração (BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads, BD Biosciences, San Jose, California, USA). Para a aquisição utilizou-se o software FACSDiva™ (BD Pharmingen™), adquirindo 150 000 células. Na análise utilizou-se o software Infinicyt 1.2™ (Cytognos, Salamanca, Spain). Os resultados foram expressos em termos de intensidade média de fluorescência (IMF).

## **2.5. Estudo fenotípico dos monócitos, linfócitos e neutrófilos por citometria de fluxo**

No estudo fenotípico dos leucócitos por citometria de fluxo foi utilizado o seguinte painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, que se encontra esquematizado na tabela 4. Os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences (San Jose, California, USA: CD3-APC, clone SK7; CD8-Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), clone SK1; CD13-PE, clone L138; CD14-APC, clone MφP9; CD14-APC-H7, clone MφP9; CD15-FITC, clone MMA; CD34-APC, clone 8G12; CD45-PerCp-Cy™5.5), clone 2D1; CD56-PE, clone MY31), da Immunotech® (Marseille, France: CD11b-FITC, clone Bear1; CD16-PE, clone 3G8; CD19-Ficoeritrina cianina 7 (PC7), clone J3-119; CD64-PE, clone 22) e da BD Pharmingen™ (Glostrup, Denmark: CD4-Pacific Blue, clone RPA-T4; CD36-FITC, clone CB38; HLA-DR-PerCp-Cy5.5, clone L243), da Invitrogen™ (Frederick, USA: CD45-Pacific Orange, clone HI30) e da Immunostep (Salamanca, Spain: IREM-2-APC).

Tabela 4 – Pannel de anticorpos e respetivos fluorocromos utilizados.

População leucocitária a estudar	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Linfócitos	4	45	8	16+56	-	19	3	-
Monócitos	4	45	36	16	HLA-Dr	-	14	-
Monócitos	-	45	16	64		-	14	-
Monócitos	-	45	11b	16		-	IREM-2	14
Neutrófilos	-	-	11b	13	45	-	34	-
Neutrófilos	-	-	15	16	45	-	10	-

Para o estudo imunofenotípico, adicionou-se em cada tubo 100 µl de sangue e uma quantidade apropriada de anticorpos monoclonais e incubou-se 15 minutos no escuro e à TA. Para a lise dos eritrócitos, adicionou-se 2ml de solução de lise (FACS Lysing Solution) e incubou-se durante 15 minutos nas mesmas condições anteriores. As células foram posteriormente centrifugadas, a 1500 rpm durante 5 minutos e depois o sobrenadante foi rejeitado. De seguida, adicionou-se 3 ml de BD FACSFlow™ e centrifugou-se novamente. Por fim, as amostras foram suspensas em 0,5 ml de BD FACSFlow™.

A aquisição das amostras foi realizada no citómetro de fluxo BD FACSCanto™ II da Becton Dickinson®, após ter sido efetuado o controlo de qualidade diário com esferas fluorescentes de configuração (BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads, BD Biosciences, San Jose, California, USA). Para a aquisição utilizou-se o software FACSDiva™ (BD Pharmingen TM), adquirindo 150 000 células. Na análise utilizou-se o software Infinicyt 1.2™ (Cytognos, Salamanca, Spain). Os resultados foram expressos em termos de percentagem das células positivas para o respetivo antígeno em cada tipo celular e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) respetiva.

## **2.6. Estatística**

Para efeitos de análise e tratamento estatístico dos dados obtidos, utilizou-se o programa informático Microsoft® Excel 2002 e Statistical Package for Social Sciences (SPSS para o Windows™ versão 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA). As variáveis numéricas contínuas, foram analisadas através das medidas descritivas, percentis 25, 50 e 75 e as variáveis nominais foram analisadas sob a forma de frequências absolutas e/ou relativas.

Para a análise das diferenças entre os grupos estudados, utilizaram-se os testes não-paramétricos: Mann-Whitney ou de Wilcoxon, conforme as amostras fossem independentes ou emparelhadas, respetivamente. O nível de significância foi de 95% ( $\alpha=0,05$ ).



### **3. Resultados**



### 3.1. Caracterização da amostra

As características do grupo de doentes encontram-se sumariadas na tabela 5.

Tabela 5 – Características clínicas dos doentes com ICC.

	Doentes com ICC (n=15)
<b>Hipertensão</b>	13 (86,7%)
<b>Diabetes</b>	5 (33,3%)
<b>Etiologia:</b> Isquémica Não-isquémica	8 (53,3%) 7 (46,7%)
<b>Disfunção ventricular esquerda:</b> Ligeira Moderada Grave	2 (13,3%) 7 (46,7%) 6 (40,0%)
<b>Classe NYHA:</b> I II III IV	8 (53,3%) 4 (26,7%) 3 (20,0%) 0 (0%)
<b>Medicação:</b> Inibidores ECA $\beta$ -bloqueadores Antiplaquetários Dislipidémicos Diuréticos Espironolactona Antidiabéticos orais Insulina NPH Anticoagulantes orais	13 (86,7%) 14 (93,3%) 9 (60,0%) 11 (73,3%) 13 (86,7%) 4 (26,7%) 4 (26,7%) 3 (20,0%) 2 (13,3%)

Na figura 4 encontram-se representados os parâmetros analíticos determinados nos doentes com ICC, divididos em dois grupos segundo a classe funcional de NYHA: classe I e classe II/III. Devido ao número reduzido de doentes com ICC estudados, não foi possível dividir em 4 grupos, de acordo com as 4 classes existentes na classificação de NYHA. Apesar do aumento da mediana, entre os dois grupos definidos, nos parâmetros PCR ( $P50=2,65$  mg/L

versus P50=5,30 mg/L), BNP (P50=116,95 pg/mol versus P50=399,60 pg/mol) e creatinina (P50=0,98 mg/dl versus P50=1,10 mg/dl), os resultados não foram estatisticamente significativos. O mesmo se verificou no número de leucócitos, contudo apresentaram uma diminuição da mediana (P50= 7,62x10<sup>9</sup>/L versus P50=6,82x10<sup>9</sup>/L). Por outro lado, a diminuição da HGB com o aumento da classe de NYHA foi estatisticamente significativa (p=0,020).

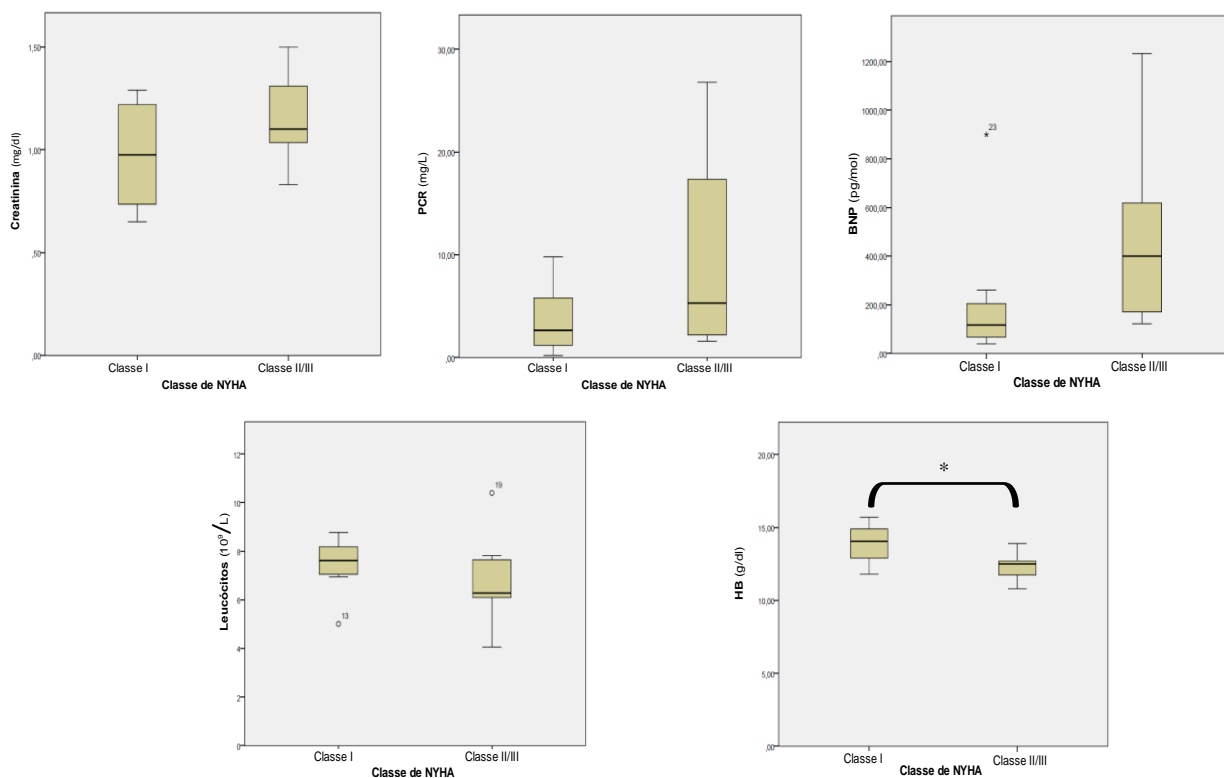


Figura 4 – Parâmetros analíticos nos doentes com ICC, de acordo com a classe funcional de NYHA. \*Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney, nos doentes com ICC, divididos em dois grupos: classe NYHA I e classe NYHA II/III ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.2. Análise fenotípica dos leucócitos

A análise das populações leucocitárias seguiu uma série de estratégias de *gate* (região de análise onde se encontram as células de interesse) para a identificação de cada tipo leucocitário. Assim, começou-se por identificar os eventos a serem excluídos da análise: nos *dot-plots* FSC versus SSC e SSC versus CD45 (figura 5 – A e B) foram selecionados os restos celulares e no *dot-plot* FSC-A (área) versus FSC-H (altura) [figura 5 – C] selecionaram-se os dupletos. Seguidamente, foram identificados os diferentes tipos de leucócitos nos *dot-plots* FSC versus SSC e SSC versus CD45, pelas suas características de *forward scatter* (tamanho), *side scatter* (granularidade) e pela intensidade de expressão de CD45 (figura 6 – A e B). Para uma melhor delimitação dos monócitos, ainda se recorreu ao *dot-plot* SSC versus CD14, para uma correta separação destas células relativamente aos granulócitos.

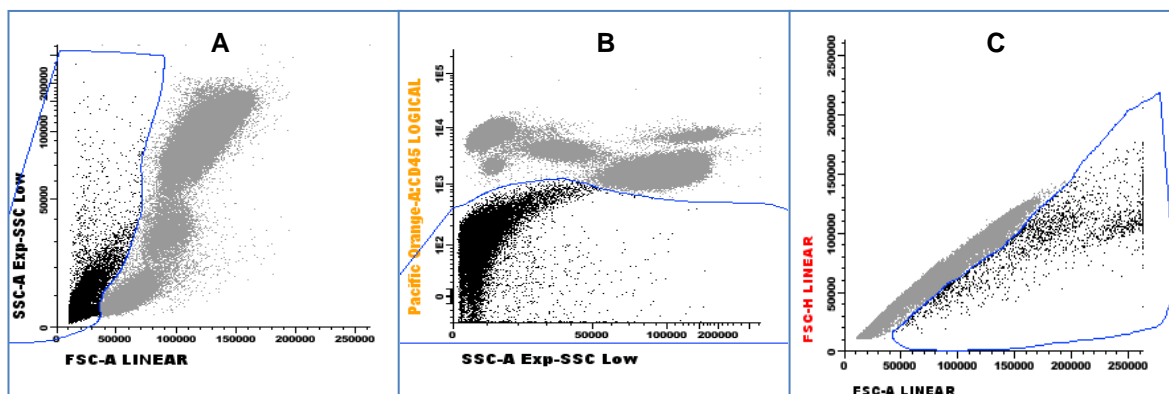


Figura 5 – Representação gráfica da identificação dos eventos a serem excluídos da análise: (A e B) – Seleção da região dos restos celulares (CD45-, eventos a preto), nos *dot-plots* FSC versus SSC e SSC versus CD45; (C) – Seleção dos dupletos (eventos a preto) no *dot-plot* FSC-A versus FSC-H.

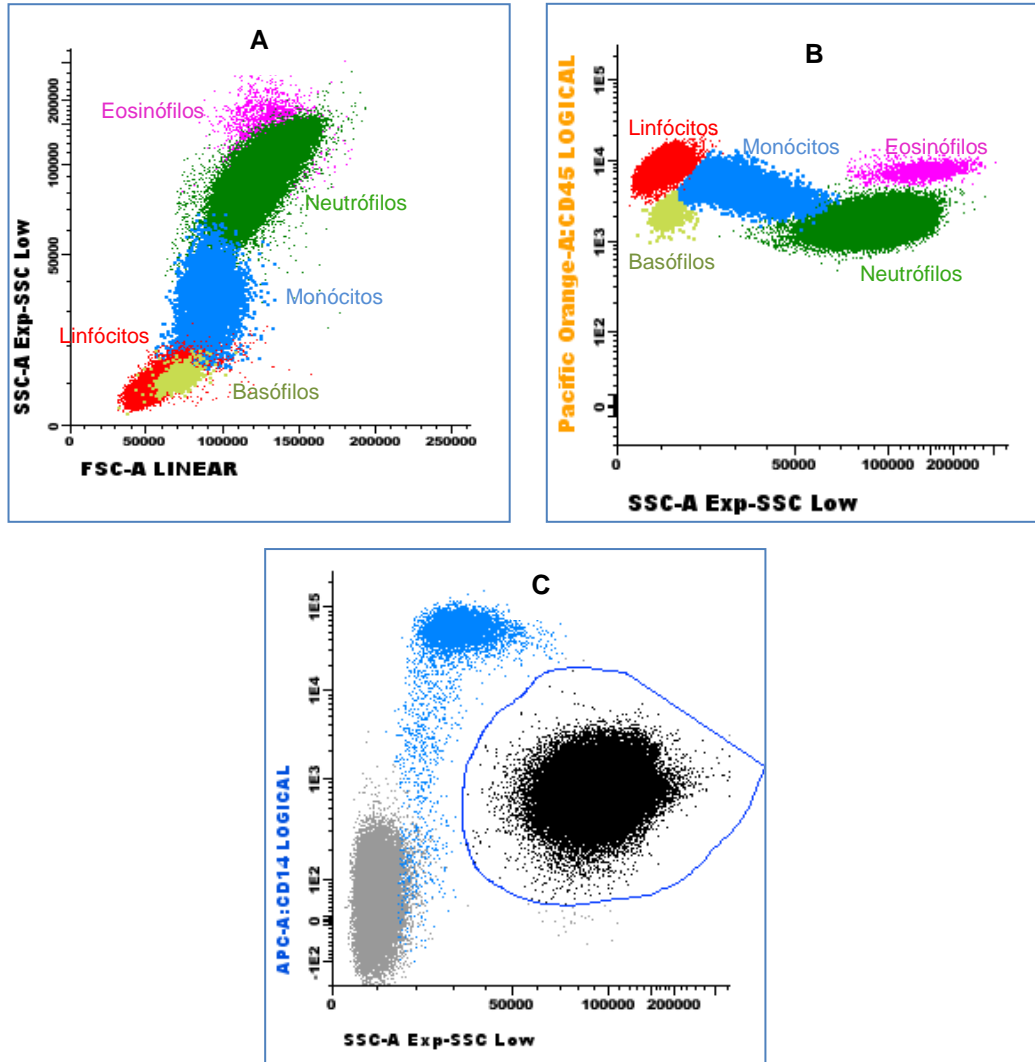


Figura 6 – Identificação das populações leucocitárias, numa amostra de sangue periférico normal: (A e B) Identificação dos diferentes tipos de leucócitos pelo seu tamanho e granularidade (*dot-plot* FSC versus SSC) e pela intensidade de expressão de CD45 (SSC versus CD45): Linfócitos -  $FSC^{baixo}SSC^{baixo}CD45^{++}$ ; Monócitos -  $FSC^{alto}SSC^{intermédio}CD45^{+}$ ; Neutrófilos -  $FSC^{alto}SSC^{alto}CD45^{+}$ ; Eosinófilos -  $FSC^{alto}SSC^{alto}CD45^{+}$ ; Basófilos -  $FSC^{baixo}SSC^{baixo}CD45^{+}$ ; (C) Gate efetuado nos granulócitos (eventos a preto) no *dot-plot* SSC versus CD14, separando-os das células mononucleares.

Na tabela 6 encontra-se representada a análise efetuada nos participantes deste estudo, relativamente aos diferentes tipos de leucócitos. Na comparação entre o grupo de doentes e o grupo controlo, observaram-se diferenças estatisticamente significativas nos linfócitos ( $p=0,010$ ), monócitos ( $p=0,025$ ), nos neutrófilos ( $p=0,022$ ) e nas células  $CD34^+$  ( $p=0,05$ ). Verificou-se uma diminuição da percentagem de linfócitos nos doentes com ICC (P50=18,85% *versus* P50=28,30%) e um aumento da percentagem de neutrófilos (P50=70,16% *versus* P50=62,14%) e de monócitos nos mesmos doentes (P50=7,76% *versus* P50=5,54%).

Tabela 6 – Análise dos tipos de leucócitos nos participantes do estudo.

Parâmetro	Grupo ICC			Grupo Controlo			Valor de p*
	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	
<b>Linfócitos (%)</b>	14,76	18,85	24,88	24,07	28,30	30,09	0,010
<b>Monócitos (%)</b>	5,37	7,76	8,51	4,8475	5,54	6,51	0,025
<b>Neutrófilos (%)</b>	64,81	70,16	74,42	60,07	62,14	66,76	0,022
<b>Eosinófilos (%)</b>	1,14	2,25	3,84	1,97	2,90	4,60	0,205
<b>Basófilos (%)</b>	0,48	0,54	0,98	0,53	0,72	1,01	0,317
<b>Células CD34+ (%)</b>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,050

\* Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre o grupo de doentes com ICC e o grupo controlo ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3. Análise fenotípica dos monócitos:

Dentro do *gate* efetuado anteriormente nos monócitos, procedeu-se à sua divisão, em três subpopulações no *dot-plot* CD14 *versus* CD16 (figura 7), conforme a intensidade de expressão destes marcadores:

- Monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> - foram definidos pela expressão forte de CD14 e a ausência de expressão de CD16;
- Monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> - foram definidos pela expressão forte de ambos os marcadores;
- Monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> - foram definidos pela expressão fraca (heterogénea) de CD14 e a expressão forte de CD16.

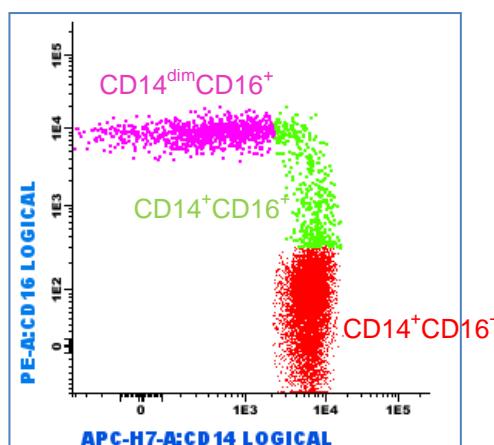


Figura 7 – Definição das subpopulações monocíticas (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), no *dot-plot* CD14 *versus* CD16.

As subpopulações monocíticas foram observadas e quantificadas no grupo de doentes com ICC e no grupo controlo (tabela 7). No grupo controlo, observou-se que a subpopulação maioritária (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) representava 85,48% dos monócitos do sangue periférico, enquanto as subpopulações CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e a CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> contabilizavam 7,33% e 8,02%, respetivamente. Em comparação com o grupo controlo, os doentes com ICC tiveram um ligeiro aumento da subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (9,77% *versus* 7,33%), com consequente diminuição dos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (81,72% *versus* 85,48%). Contudo, as diferenças das percentagens das subpopulações monocíticas, entre os dois grupos estudados, não foram estatisticamente significativas.



Tabela 7 – Percentagem das subpopulações monocíticas, nos grupos de doentes e controlos.

	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> (%)	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> (%)	CD14 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup> (%)
<b>Grupo ICC</b>	81,72±5,23	9,77±2,78	8,53±3,75
<b>Grupo Controlo</b>	85,48±5,66	7,33±3,18	8,02±4,38
<b>Valor p*</b>	0,922	0,626	0,733

Resultados expressos como média±desvio padrão. \* Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre o grupo de doentes com ICC e o grupo controlo ( $\alpha=0,05$ ).

Na divisão dos doentes com ICC nos dois grupos formados, de acordo com a classificação de NYHA (tabela 8), observaram-se diferenças estatisticamente significativas na subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,037$ ), que apresentou uma diminuição da sua percentagem na classe de NYHA II/III (6,70% *versus* 10,14%). Embora não se obtivesse diferenças estatísticas na percentagem das outras subpopulações, a subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> estava ligeiramente aumentada na classe de NYHA II/III (83,93% *versus* 79,78%), enquanto que a subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> diminuiu a sua percentagem na classe de NYHA II/III (9,38% *versus* 10,11%).

Tabela 8 – Percentagem das subpopulações monocíticas nos doentes com ICC, conforme a classe de NYHA.

Subpopulação monocítica	Classe NYHA I (n=8)	CLASSE NYHA II/III (n=7)	Valor p*
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	79,78±5,52	83,93± 4,18	0,132
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	10,11±3,67	9,38±1,39	0,817
CD14 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	10,14±3,29	6,70±3,58	0,037

Resultados expressos como média±desvio padrão. \* Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre os grupos de doentes com ICC: classe NYHA I e classe NYHA II/III ( $\alpha=0,05$ ).

As subpopulações monocíticas foram estudadas relativamente à expressão de antígenos pelos monócitos: CD4, CD11b, CD36, CD45, CD64, HLA-Dr, IREM-2 e às características físicas das células (FSC e SSC). A

expressão dos diferentes marcadores celulares analisados nos monócitos está representada na figura 8.

O imunofenótipo de cada subpopulação monocítica encontra-se seguidamente descrito, tendo-se verificado diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), na expressão dos diferentes marcadores.

Os monócitos  $CD14^+CD16^-$  possuíam uma expressão forte de CD11b, CD36 e CD64, contrastando com uma expressão fraca dos antígenos HLA-Dr e CD4. Expressavam ainda os antígenos CD45 e IREM-2, com uma IMF inferior às restantes subpopulações monocíticas. Esta subpopulação apresentou ainda um maior SSC e um menor FSC que as restantes.

A subpopulação  $CD14^+CD16^+$  foi a que apresentou uma expressão mais elevada de CD11b, CD36, HLA-Dr, IREM-2 e CD4. Por sua vez, os antígenos CD64 e o CD45 exibiram uma expressão intermédia, comparativamente com as outras subpopulações monocíticas. Esta subpopulação foi a que apresentou maior FSC e um SSC intermédio.

Os monócitos  $CD14^{dim}CD16^+$  expressaram níveis mais baixos de CD11b, CD36 e CD64, do que as outras subpopulações. Apresentaram uma intensidade de expressão intermédia para os marcadores IREM-2 e HLA-Dr. O CD4 possuía uma IMF semelhante aos monócitos clássicos. Foi a subpopulação que teve menor SSC, FSC intermédio e maior intensidade de expressão de CD45.

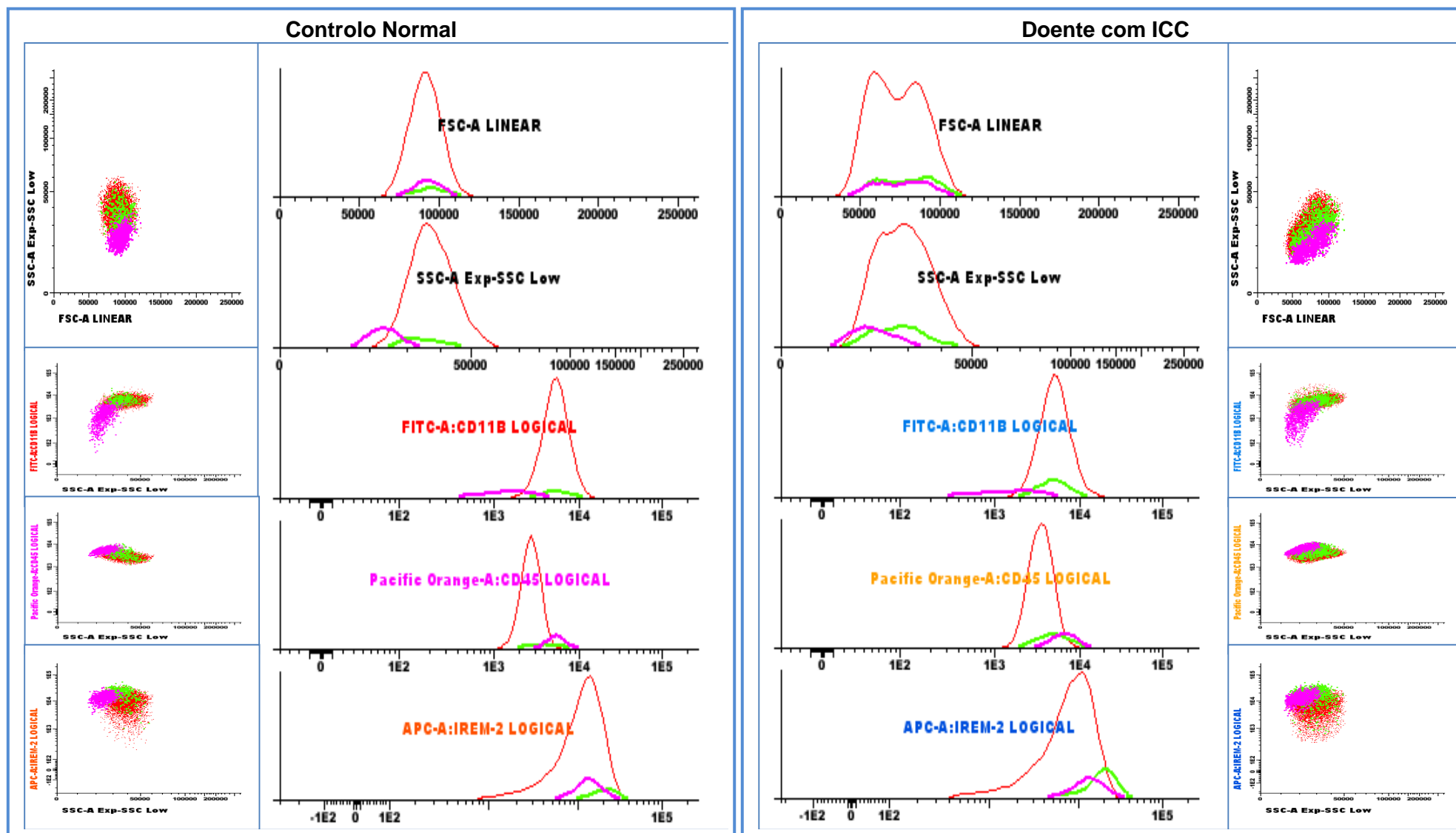


Figura 8 – Representação gráfica da intensidade de expressão dos marcadores celulares estudados, nas subpopulações monocíticas, comparando um exemplo de um caso típico do grupo controlo, com um caso típico do grupo de doentes com ICC.

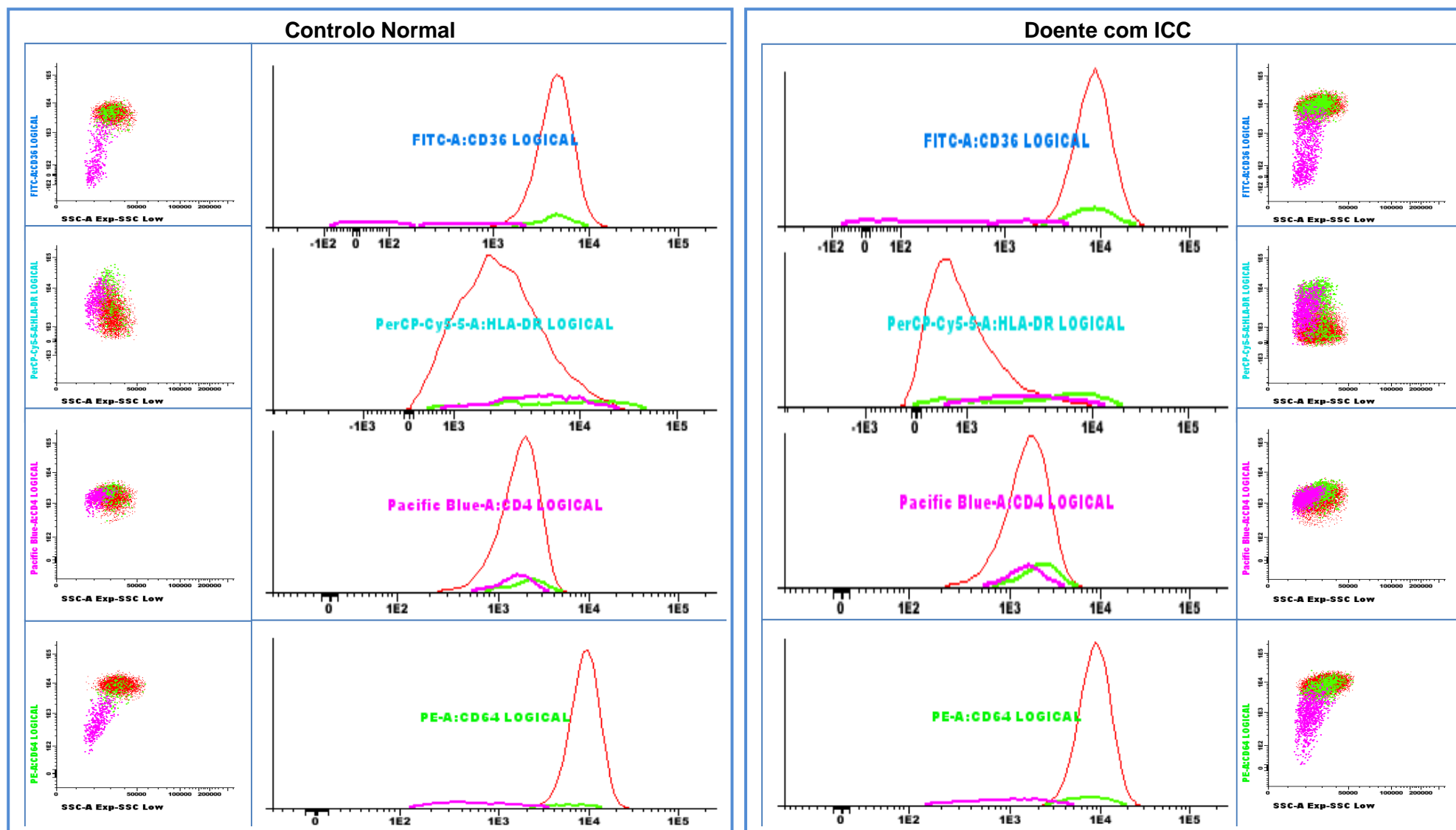


Figura 8 – Representação gráfica da intensidade de expressão dos marcadores celulares estudados, nas subpopulações monocíticas, comparando um exemplo de um caso típico do grupo controlo, com um caso típico do grupo de doentes com ICC (continuação).

Na figura 9 encontram-se representados os diagramas de caixa, referentes aos parâmetros celulares estudados nos monócitos. Na comparação da expressão dos parâmetros analisados, observaram-se nas três subpopulações monocíticas, uma diminuição estatisticamente significativa do valor do CD45, HLA-Dr e FSC ( $p < 0,05$ ), nos doentes em comparação com os controlos. Também foram encontradas diferenças nos monócitos  $CD14^+CD16^-$ , para o antígeno CD11b ( $p < 0,05$ ), apresentando uma diminuição na sua expressão celular. Nos marcadores celulares CD4, CD36, CD64 e IREM-2 observou-se um aumento ligeiro da sua expressão no grupo de doentes, no entanto, essas diferenças não foram significativas em termos estatísticos.

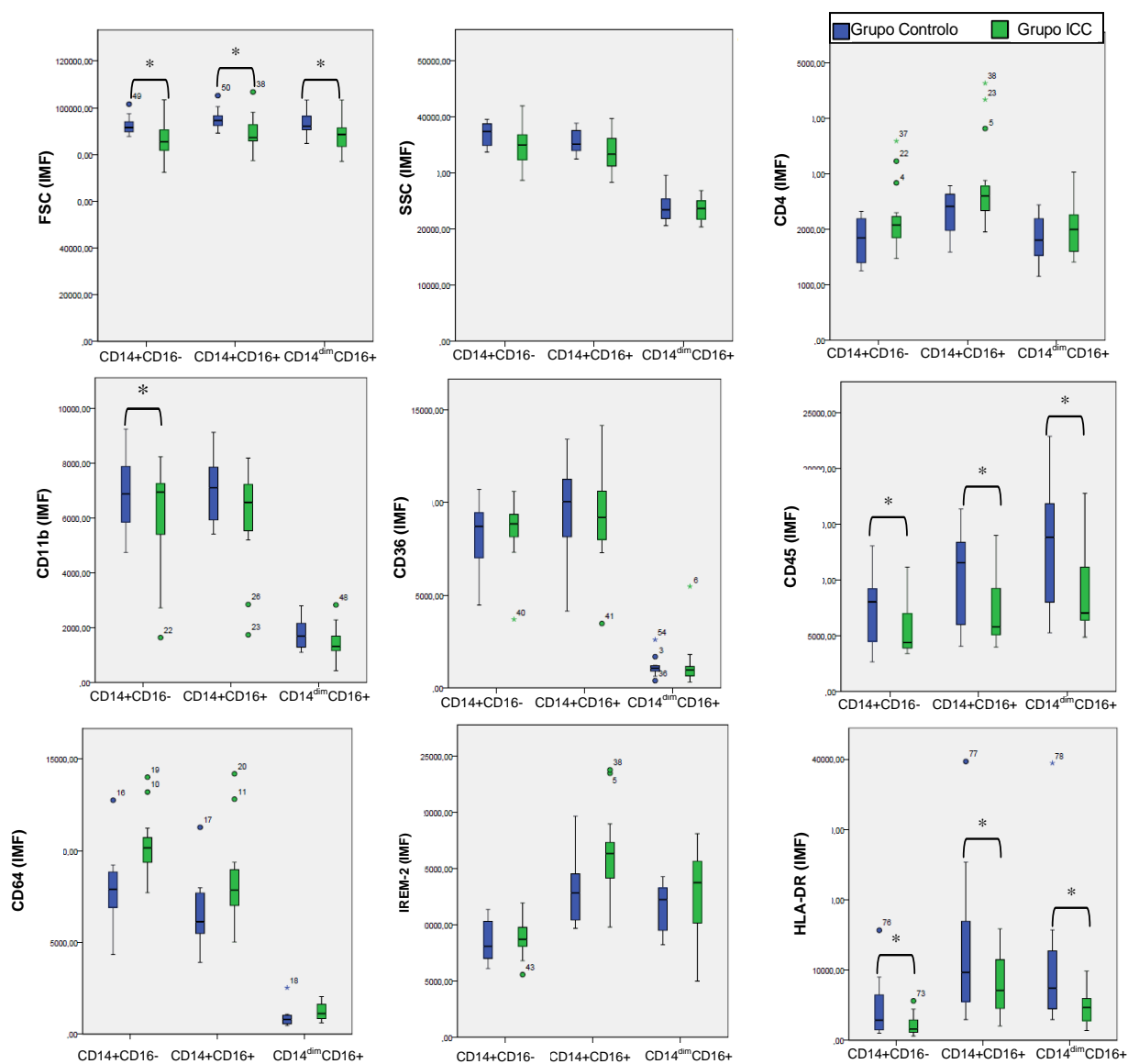


Figura 9 – Diagramas de caixa apresentado a IMF dos marcadores celulares nas subpopulações monocíticas, no grupo de doentes e no grupo de controlo. \* $p < 0,05$ , valor de prova referente ao teste Mann-Whitney, entre o grupo de doentes e o grupo controlo ( $\alpha = 0,05$ ).

Nas subpopulações monocíticas identificadas foi também analisada a expressão dos TLR2 e TLR4 (figura 10 e 11).

Na expressão do TLR2 nos participantes deste estudo, observou-se que a subpopulação  $CD14^+CD16^+$  apresentou uma IMF superior aos outros subtipos de monócitos, tendo a subpopulação  $CD14^{dim}CD16^+$  apresentado uma expressão mais fraca deste recetor (figura 10). Na comparação da expressão do TLR2, entre o grupo de doentes e controlos, verificou-se uma ligeira sobre-expressão nos doentes com ICC, nas subpopulações  $CD14^+CD16^-$  e  $CD14^+CD16^+$  (figura 11). A subpopulação  $CD14^{dim}CD16^+$  apresentou uma diminuição significativa da sua expressão ( $p=0,002$ ), entre o grupo de doentes e os controlos.

Na expressão do TLR4 nos monócitos dos mesmos indivíduos, verificou-se que as subpopulações  $CD14^+CD16^+$  e  $CD14^{dim}CD16^+$  apresentaram uma expressão mais forte do TLR4, em comparação com a subpopulação maioritária. De forma inversa, a subpopulação  $CD14^+CD16^-$  foi a que obteve uma intensidade de fluorescência mais fraca do TLR4 (figura 10).

Os doentes com ICC apresentaram um ligeiro aumento da expressão do TLR4, comparativamente com o grupo controlo (figura 11). Porém, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, na expressão deste recetor entre as subpopulações monocíticas.

De salientar, que a expressão deste recetor apresentou valores de IMF muito heterogéneos, uma vez que, em alguns indivíduos (controlos e doentes), a subpopulação  $CD14^+CD16^+$  obteve uma IMF superior aos monócitos  $CD14^{dim}CD16^+$  e noutros indivíduos ocorreu o inverso. Em 6 controlos (50,0%) e em 6 doentes (40%), a subpopulação  $CD14^{dim}CD16^+$  foi a que teve uma IMF superior no TLR4. Este subtipo de monócitos apresentou em dois doentes com ICC, uma IMF muito elevada, obtendo o dobro da IMF observada na subpopulação  $CD14^+CD16^+$ .

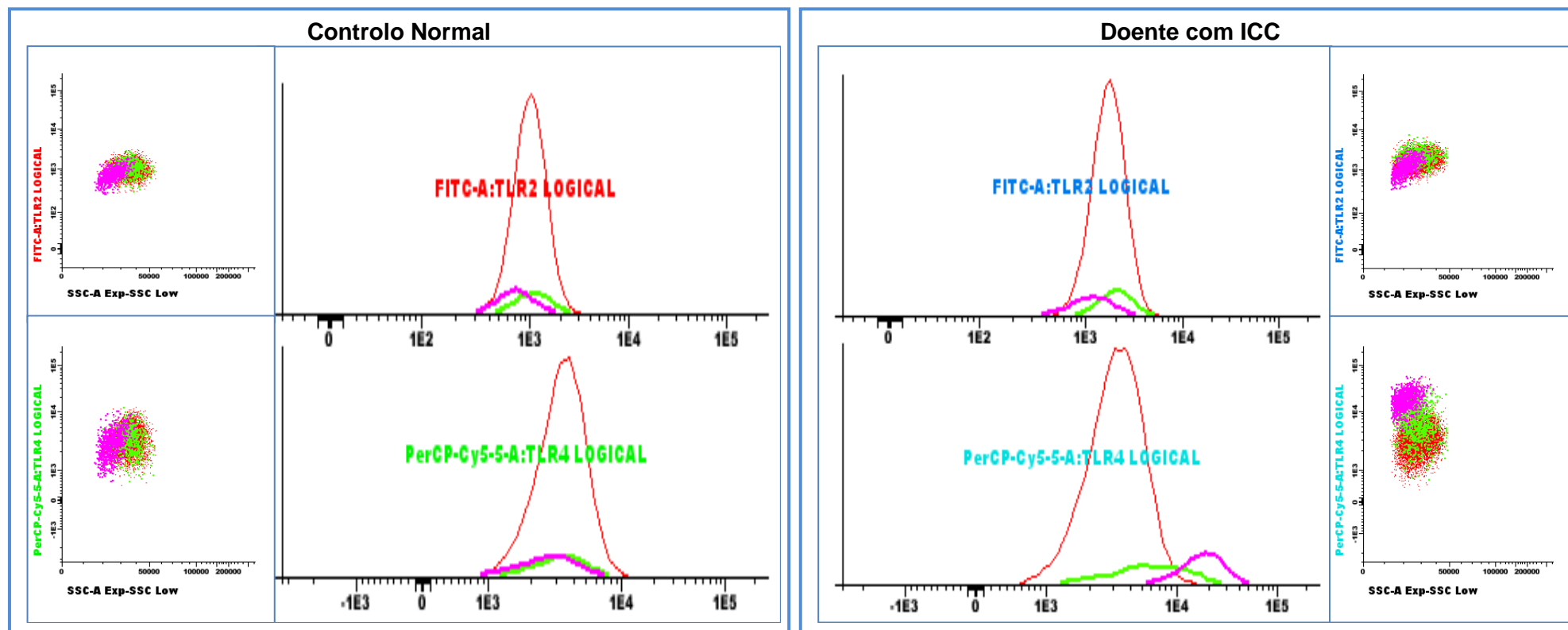


Figura 10 – Representação gráfica da intensidade de expressão dos TLR2 e TLR4 nas subpopulações monocíticas, comparando um exemplo de um caso típico do grupo controlo, com um caso típico do grupo de doentes com ICC.

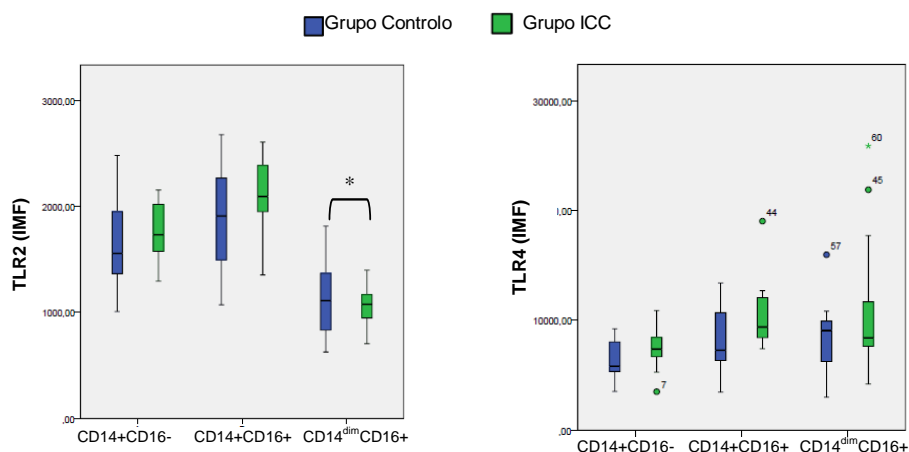


Figura 11 – Diagramas de caixa apresentando a IMF, entre o grupo de doentes e o grupo controlo. \* $p < 0.05$ , valor de prova referente ao teste Mann-Whitney, entre o grupo de doentes e o grupo controlo ( $\alpha=0.05$ ).

Na figura 12 encontra-se representado a expressão dos TLR2 e TLR4, divididos em dois grupos: classe NYHA I e classe NYHA II/III. Na análise destes resultados, verificou-se que a classe de NYHA I apresentou uma expressão mais elevada dos TLR2 e TLR4, do que na classe NYHA II/III, em quase todas as subpopulações monocíticas. Com a exceção da subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> no TLR4, a classe que apresentou uma IMF superior foi a classe NYHA II/III.

O padrão de expressão do TLR2, dividido nas classes de NYHA foi semelhante ao apresentado na comparação entre os grupos de doentes e controlos. A subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foi a que obteve maior IMF nos dois grupos definidos e a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> a que obteve menor IMF. A subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,005$ ), entre a classe NYHA I e a classe NYHA II/III.

Relativamente ao TLR4, observou-se também um padrão de expressão semelhante à comparação entre doentes e controlos. Em termos estatísticos, não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados.



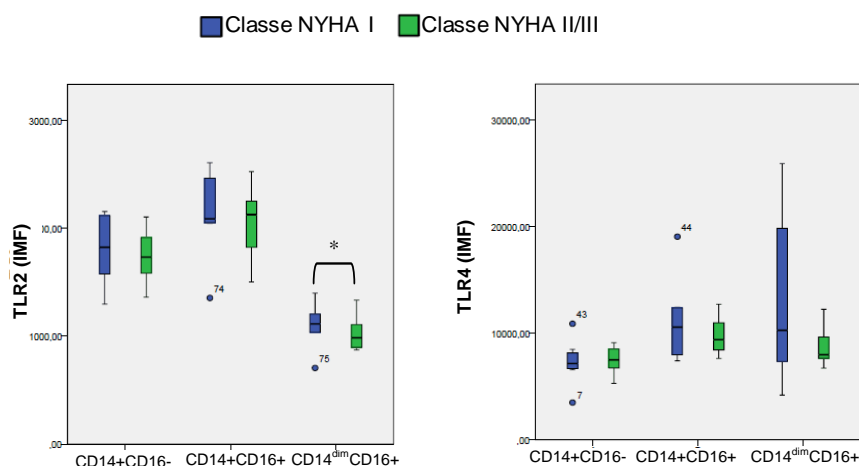
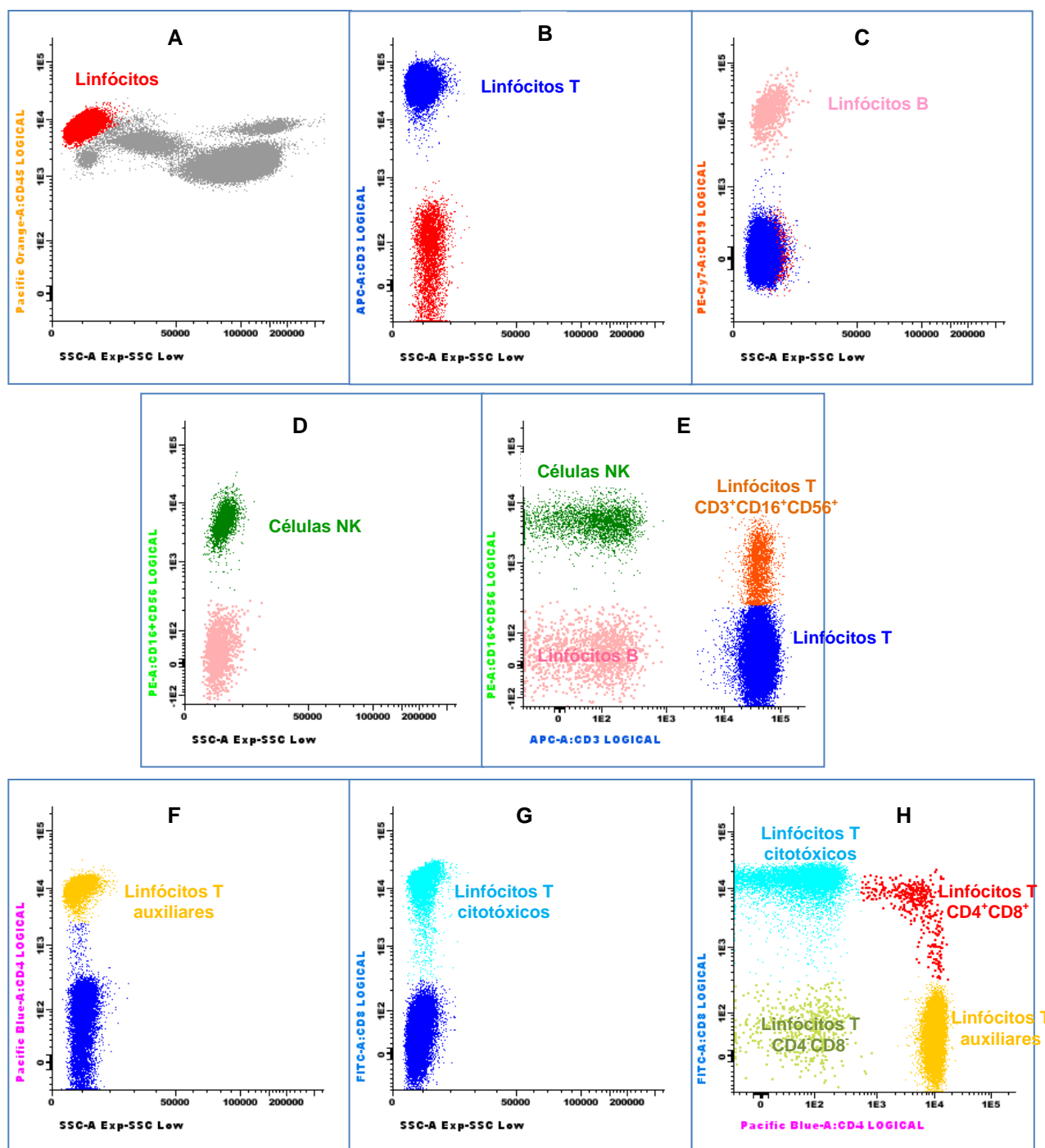


Figura 12 – Diagramas de caixa apresentando a IMF, entre os grupos: classe de NYHA I e classe de NYHA II/III. \* $p < 0,05$ , valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre os grupos de doentes com ICC: classe NYHA I e classe NYHA II/III ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.5. Análise fenotípica dos linfócitos:

As populações linfocitárias foram analisadas dentro do *gate* linfocitário efetuado anteriormente. Os linfócitos T auxiliares foram identificados pela expressão simultânea de CD3 e CD4; os linfócitos T citotóxicos foram definidos pela expressão de CD3 e CD8; os linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram identificados pela expressão simultânea de CD3, CD4 e CD8; os linfócitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> foram definidos pela expressão de CD3 e a ausência de expressão de CD4 e de CD8; os linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> foram definidos pela expressão de CD3, CD16 e CD56; os linfócitos B foram identificados pela positividade de CD19; e as células NK pela expressão dos marcadores CD16 e CD56 e pela ausência de expressão de CD3 (figura 13).



Na tabela 9 encontra-se representada a análise descritiva (percentis 25, 50 e 75) e a análise inferencial das populações linfocitárias, do grupo de controlo e do grupo de doentes com ICC. Na avaliação da frequência (%) de cada população linfocitária, entre os dois grupos estudados, apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (p=0,016) e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (p=0,028).

Tabela 9 – Análise comparativa das populações linfocitárias.

População linfocitária	Grupo ICC			Grupo de controlo			p*
	P25	P50	P75	P25	P50	P75	
Linfócitos T dentro do total de linfócitos (%)	77,52	80,57	87,18	76,52	78,76	83,75	0,558
Linfócitos T auxiliares dentro dos linfócitos T (%)	54,32	62,22	69,33	51,96	58,31	62,62	0,283
Linfócitos T citotóxicos dentro dos linfócitos T (%)	24,78	31,82	42,28	32,52	35,00	39,38	0,242
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> dentro dos linfócitos T (%)	1,07	1,97	2,40	0,83	1,04	1,41	0,016
Linfócitos T CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> dentro dos linfócitos T (%)	1,43	2,12	3,51	2,31	4,24	7,61	0,028
Linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> dentro dos linfócitos T (%)	5,34	6,84	14,55	6,38	7,79	11,04	0,884
Linfócitos B dentro do total de linfócitos (%)	3,51	6,72	11,92	9,37	10,32	11,19	0,107
Células NK dentro do total de linfócitos (%)	8,04	11,03	16,29	6,84	10,86	13,38	0,575

Abreviaturas: P, percentil.

\* Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre o grupo de doentes com ICC e o grupo de controlo ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.6. Análise fenotípica dos neutrófilos:

Dentro do *gate* dos neutrófilos efetuado previamente, observou-se a expressão dos antígenos celulares CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16 e CD45 e dos parâmetros FSC e SSC (figura 14). Pela intensidade de expressão dos marcadores CD11b e CD13, avaliou-se a presença de precursores neutrofílicos (figura 14-B): metamielócitos -  $CD11b^{+fraco}CD13^{+forte}$ ; mielócitos  $CD11b^{+fraco}CD13^{+fraco}$ . A IMF para estes marcadores foi registrada nos neutrófilos maduros ( $CD11b^{+forte}CD13^{+forte}$ ).

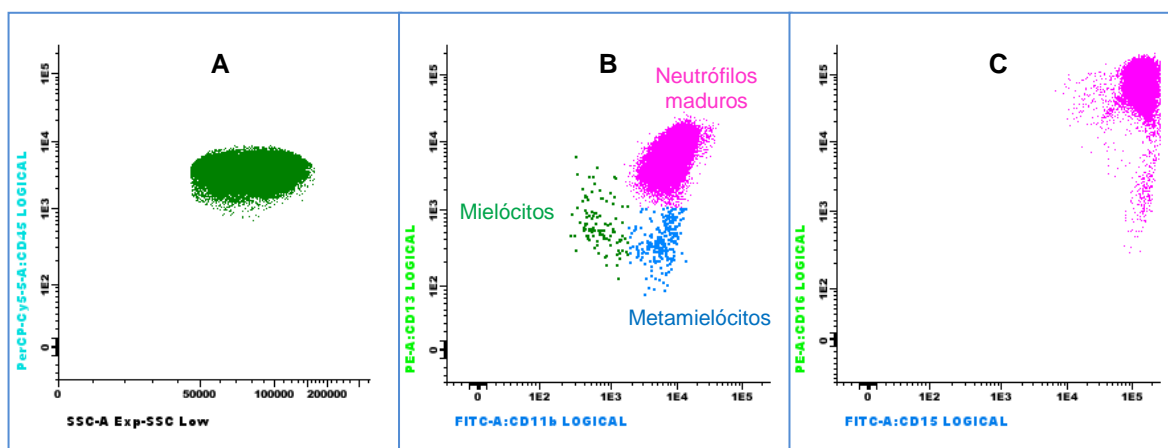


Figura 14 – Análise dos neutrófilos: (A) Seleção dos neutrófilos no *dot-plot* SSC versus CD45; (B) Divisão dos neutrófilos (neutrófilos, metamielócitos e mielócitos), no *dot-plot* CD11b versus CD13 (C) Expressão dos antígenos CD15 e CD16 nos neutrófilos (*dot-plot* CD15 versus CD16).

A análise estatística dos antígenos celulares e das características físicas (FSC e SSC) dos neutrófilos encontra-se esquematizada na tabela 11.

O FSC, a percentagem de neutrófilos maduros e de metamielócitos evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados ( $p=0,036$ ;  $p=0,039$ ;  $p=0,024$ , respetivamente). Observou-se assim uma diminuição do tamanho celular dos neutrófilos, da percentagem de neutrófilos maduros e um aumento dos metamielócitos nos doentes com ICC.

Tabela 10 – Análise comparativa dos parâmetros celulares estudados nos neutrófilos.

	Grupo ICC			Grupo Controlo			p*
	P25	P50	P75	P25	P50	P75	
Neutrófilos maduros (%) no total de neutrófilos	99,81	99,91	99,95	99,93	99,98	99,98	0,039
Metamielócitos (%) no total de neutrófilos	0,04	0,06	0,14	0,02	0,03	0,06	0,024
Mielócitos (%) no total de neutrófilos <sup>1</sup>	0,02	0,04	0,09	0,01	0,03	0,08	0,617
SSC	73067,13	84608,21	88084,59	82247,71	91324,09	94331,04	0,079
FSC	104437,02	108616,36	114356,81	110921,64	114559,43	120078,25	0,036
CD10 (IMF)	4022,45	4287,82	5817,78	3631,85	4559,41	7646,05	0,712
CD11b (IMF)	5913,36	6982,23	8365,54	4603,61	6584,75	7557,04	0,407
CD13 (IMF)	5482,37	6569,37	6920,14	5022,49	5847,49	8125,26	0,770
CD15 (IMF)	83390,95	105233,46	131821,29	79698,38	117666,79	131077,54	0,696
CD16 (IMF)	78975,38	85014,37	96653,79	65238,72	85158,32	103897,66	0,961
CD45 (IMF)	3136,97	3496,49	3691,94	2505,88	3474,96	4303,52	0,845

Abreviaturas: P, percentil.

\* Valor de prova referente ao teste Mann-Whitney entre o grupo de doentes com ICC e o grupo controlo ( $\alpha=0,05$ ).

1\* Não se observaram mielócitos em todos os participantes do estudo: observaram-se em 10 doentes com ICC e em 4 controlos.



## **4. Discussão**





## 4. Discussão

No presente estudo analisou-se a imunidade inata em doentes com insuficiência cardíaca crónica, particularmente o papel dos monócitos neste tipo de imunidade.

Este estudo foi limitado pelo baixo número de doentes incluídos, o que poderá condicionar a interpretação dos resultados e consequentes conclusões.

A gravidade dos doentes com ICC foi classificada de acordo com os critérios da classificação funcional de NYHA. Devido à reduzida dimensão amostral, não foi possível dividir os doentes em 4 grupos, conforme a existência de 4 classes de NYHA tendo sido divididos apenas em 2 grupos (classe de NYHA I e classe de NYHA II/III).

Perante os dados analisados constatou-se que a HGB diminuiu a sua concentração, com o aumento da classe de NYHA, revelando diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados vão de encontro à literatura publicada, que refere o aparecimento de anemia em doentes com ICC (55,56).

Os doentes com IC estão associados a uma deterioração da função renal, podendo em estadios mais avançados da patologia desenvolver insuficiência renal (57). Sendo a creatinina, um dos marcadores da função renal, esta foi estudada. Os seus níveis apresentaram nos doentes da classe de NYHA II/III, um ligeiro aumento comparativamente com os doentes da classe de NYHA I, não revelando diferenças estatisticamente significativas.

O péptido natriurético do tipo B (BNP) é um biomarcador útil para o diagnóstico, estratificação do risco, avaliação prognóstica e monitorização da terapêutica na IC (58,59). Este biomarcador não revelou diferenças significativas, nos níveis plasmáticos de BNP entre os dois grupos constituídos, classe I e classe II/III de NYHA, embora se tenha verificado um aumento do BNP no grupo de NYHA classe II/III.

Nos doentes com ICC também foi estudada a proteína C reativa (PCR), que é um biomarcador de inflamação sistémica e da lesão tecidual (7,60). Os níveis séricos da PCR não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos definidos (classe I e classe II/III de NYHA), observando-se um aumento da sua concentração no grupo de doentes com

classe de NYHA II/III. Do mesmo modo que o BNP, vários estudos associaram o aumento da PCR com uma maior progressão e gravidade da doença (61).

O número de leucócitos nos doentes da classe de NYHA II/III tiveram uma diminuição do seu número, relativamente aos doentes da classe de NYHA I, apesar de não ser uma diminuição significativa. Estes resultados estão em desacordo com o estudo de Marques *et al.* (62), em que observou um aumento da concentração de leucócitos nos doentes em estádios sintomáticos mais avançados.

Os monócitos desempenham um papel crucial na defesa imunológica, na inflamação e na remodelação tecidual (18,39). Possuem na sua superfície celular, um conjunto de recetores, os TLRs, que são responsáveis pelo reconhecimento de microrganismos invasores, iniciando assim a resposta imunológica inata (1,7).

Desta forma, estudou-se a expressão de dois TLRs que estão presentes nos monócitos, o TLR2 e o TLR4. Embora a maioria de estudos sobre o TLR2 e o TLR4 tenham sido centrados no seu papel de recetor para as moléculas exógenas, também tem sido demonstrado que são ativados por várias moléculas endógenas (DAMPs), como por exemplo, as proteínas de choque térmico, o fibrinogénio e a fibronectina. (20,22,39,63). A sua ativação induz uma resposta inflamatória com produção de citocinas proinflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), processo este necessário para a reparação celular (64). Enquanto a resposta inflamatória inicial confere uma resposta protetora ao coração, uma resposta inflamatória inadequada e persistente pode levar a efeitos deletérios no coração (20,37).

Para além disso, estes recetores não são apenas expressos nas células imunológicas, mas também noutros tecidos, como é o caso do próprio coração (5,22). Estes dados, permitem assim associar a imunidade inata à IC, indicando que os monócitos poderão desempenhar um papel importante na coordenação da resposta inflamatória e na patogénese da IC.

Neste estudo avaliou-se a expressão do TLR2 e TLR4 e de vários antígenos celulares, nos monócitos do sangue periférico. Na análise dos monócitos, observou-se que estes podem-se dividir em três subpopulações de acordo com a intensidade de expressão do CD14 e CD16. A subpopulação maioritária possui uma expressão forte do CD14 e é negativa para o CD16

(CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>). As outras duas subpopulações expressam o CD16, mas diferem na intensidade de expressão do CD14: uma expressa-o fortemente (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e na outra encontra-se diminuído (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). Estas observações estão de acordo com os estudos mais recentes (17,18,53,54), nos quais foram identificadas estas subpopulações monocíticas, verificando a existência de diferenças fenotípicas e funcionais.

É de salientar que esta subdivisão dos monócitos apenas foi possível com os fluorocromos e clones utilizados neste estudo, já que com outras combinações de fluorocromos experimentadas não foi possível fazer a separação das três subpopulações monocíticas. A escolha correta do fluorocromo está dependente de algumas características, tais como: ser inerte (como por exemplo, não afetar as células ou não se ligar diretamente a elementos celulares), possuir uma intensidade de fluorescência alta, exibir uma baixa sobreposição espectral com outros fluorocromos e ser facilmente conjugado com o anticorpo monoclonal (66).

Para além da escolha da combinação dos fluorocromos, vários fatores poderão influir na possibilidade de visualização destas populações. O grande avanço em citometria de fluxo registado nos últimos anos, com o desenvolvimento da área informática (aparecimento de novos *hardware*, *software*) assim como avanços na caracterização e produção de novos fluorocromos, possibilitaram o aparecimento de citómetros de fluxo capazes de detetar 10 ou mais fluorocromos, aumentando assim a capacidade de revelar simultaneamente e rapidamente múltiplas características celulares (66). Desta forma, a existência de novos equipamentos com capacidades discriminativas altas, poderão permitir a identificação de pequenas populações que anteriormente passariam despercebidas e estas serem importantes para a compreensão da patogénese de diversas patologias.

Neste estudo foi observado que, em indivíduos saudáveis, a subpopulação monocítica CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> correspondia, em média, a 85,48% de monócitos do sangue periférico, enquanto as subpopulações CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e a CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> contabilizavam, em média, 7,33% e 8,02%, respetivamente. Estes valores obtidos em cada subpopulação estão de acordo com alguns estudos publicados (51,65).

Foram poucos os estudos que examinaram as subpopulações monocíticas na ICC. Barisione *et al.* (67) constataram que o subconjunto CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (12,3%) estava aumentado em pacientes com ICC estável e refletia a gravidade da doença. De forma inversa, o subconjunto CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (4,6%) encontrava-se diminuído nos mesmos doentes (67). Neste estudo observou-se nos doentes com ICC, um aumento da subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (9,77%), mas os monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentaram uma percentagem semelhante ao grupo controlo. Por sua vez, os monócitos clássicos tiveram uma ligeira diminuição da sua percentagem (81,72%).

Uma questão importante que se pode depreender da heterogeneidade existente nos monócitos, deve-se ao facto destas subpopulações monocíticas poderem estar relacionadas com a progressão da doença. Vários estudos concluíram que níveis elevados de monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> estavam relacionados negativamente com a recuperação ventricular esquerda, após um enfarte agudo do miocárdio e também estavam associados com uma maior mortalidade. Por sua vez, o aumento da expressão dos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> estavam associados com um melhor prognóstico em doentes com a mesma patologia (51,63). Em doentes com doença arterial coronária observaram-se concentrações elevadas de monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e de monócitos CD16<sup>+</sup>, quando comparados com os controlos saudáveis (51,54). No nosso estudo, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, com o aumento da gravidade da patologia (caracterizada pelas classes de NYHA). Esta diminuição observada, acompanhada pela diminuição ligeira da subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, assim como pela tendência de aumento da quantidade de monócitos clássicos, com o aumento da classe de NYHA, poderão estar associadas com a evolução clínica da ICC. Nas funções apresentadas na tabela 3 de cada subpopulação (39), verifica-se que os monócitos clássicos apresentam um papel relevante na resposta inflamatória inicial (fagocitose, produção de citocinas pró-inflamatórias e de ROS, remoção dos restos celulares, etc.), enquanto que os monócitos CD16<sup>+</sup> apresentam características funcionais mais tardias: a subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> pode ter uma função anti-inflamatória e a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> tem a capacidade de reparação celular. Deste modo, os doentes que se encontram na classe II/III,

estando numa fase mais avançada da doença, poderão apresentar uma resposta inflamatória mais exacerbada e consequentemente uma diminuição das subpopulações CD16<sup>+</sup> e um aumento dos monócitos clássicos. Mais estudos serão necessários para avaliar e esclarecer o papel e a quantificação das subpopulações monocíticas, na evolução e mortalidade dos doentes com IC.

Na análise da expressão dos TLR2 e TLR4 nas subpopulações monocíticas de doentes com ICC, verificou-se uma ligeira sobre-expressão destes recetores, em comparação com os controlos saudáveis, exceto na subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> para o TLR2. Contudo, em termos estatísticos a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> foi a única que demonstrou diferenças significativas na expressão do TLR2 (diminuição da sua expressão), entre o grupo de doentes com ICC e o grupo controlo.

Nas diferentes subpopulações monocíticas identificadas, observou-se que a subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foi a que apresentou uma expressão mais forte do TLR2, em comparação com as outras subpopulações monocíticas. De forma inversa, a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> possuía uma expressão mais fraca deste recetor celular. Estes resultados foram encontrados, tanto nos doentes com ICC como nos controlos. Os resultados encontrados neste trabalho científico corroboram o estudo de Skrzeczyn'ska-Moncznik *et al.* (17), realizado em indivíduos saudáveis.

Na análise do TLR4, as subpopulações CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> foram as que expressaram o TLR4 com maior intensidade. Contudo, a análise da expressão do TLR4 tem de ser cuidadosa, devido às IMFs não seguirem sempre o mesmo padrão de expressão celular nas subpopulações monocíticas: em alguns indivíduos (doentes e controlos) os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> apresentaram uma IMF superior, ao passo que noutros, a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> expressou mais intensamente este recetor. Em dois doentes com ICC verificou-se que a expressão do TLR4, na subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentou um aumento pronunciado, comparativamente com os outros subtipos de monócitos. Devido ao número reduzido de amostras incluídas neste estudo, os resultados tornam-se difíceis de valorizar.

Nos poucos estudos (41,50) em que avaliaram, em dadores saudáveis, a expressão do TLR4 nas subpopulações monocíticas, constataram que os

monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> expressavam mais intensamente este recetor. Nestes estudos, não fizeram referência às diferenças de expressão de TLR4 entre as subpopulações CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, encontradas no presente estudo.

No nosso estudo observou-se que a expressão do TLR2 e TLR4 encontrava-se ligeiramente aumentada na classe I, comparativamente com a classe II/III. Apenas nos monócitos clássicos, o TLR4 apresentou uma tendência de aumento da sua expressão na classe II/III. Contudo, em termos estatísticos, apenas a subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> no TLR2 revelou diferenças, apresentando um aumento da sua expressão na classe de NYHA I.

Földes *et al.* (68) verificaram um aumento da expressão do TLR4 na totalidade de monócitos periféricos, de doentes com ICC e os seus valores estavam relacionados diretamente com a gravidade da patologia. Neste estudo, só os monócitos clássicos tiveram uma tendência de aumento da expressão do TLR4, com o aumento da gravidade dos doentes (classe de NYHA II/III).

Relativamente à expressão de TLR2, Földes *et al.* (68) verificaram que a expressão do TLR2 foi similar ao grupo controlo. Estes resultados são de difícil discussão, por terem sido analisados na totalidade de monócitos, sem terem sido efetuados nas subpopulações monocíticas, que possuem diferentes expressões deste recetor.

A expressão de vários antigénios celulares associados à diferenciação e função dos monócitos foram avaliados experimentalmente, tendo-se verificado diferenças na intensidade de expressão celular apresentada pelas diferentes subpopulações monocíticas. Os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> expressavam níveis elevados de CD36, CD11b, contrastando com os níveis mais baixos de HLA-Dr e CD4. Esta subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> expressou ainda o IREM-2 e o CD45, mas com uma intensidade mais fraca que as subpopulações minoritárias.

A subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foi a que exibiu uma expressão mais elevada dos antigénios celulares CD11b, CD36, HLA-Dr, IREM-2 e CD4 e uma expressão intermédia do CD64 e CD45.

Como características fenotípicas, os monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentaram intensidades de expressão mais baixas dos antigénios celulares CD11b, CD36 e CD64. Exibiram ainda uma expressão intermédia de IREM-2 e

HLA-Dr, e foi a subpopulação que apresentou o antígeno CD45 com uma intensidade de expressão superior.

Na análise do fenótipo de cada subpopulação monocítica, observou-se que o IREM-2 é um marcador importante para avaliar a maturidade dos monócitos no sangue periférico. Tal facto, se deve ao IREM-2 ser uma glicoproteína restrita dos monócitos e das células dendríticas mieloides e durante a maturação dos monócitos ser expressa apenas no último estadio de maturação (monócitos), após a forte expressão de CD14 [Orfão (46), tabela 3]. Neste estudo, observou-se que este marcador era expresso em todas as subpopulações monocíticas, podendo concluir que todos os monócitos no sangue periférico eram células maduras. Contudo, o fenótipo apresentado pelos monócitos  $CD14^{dim}CD16^{+}$  suscitou algumas dúvidas relativamente à sua maturidade, uma vez que esta subpopulação apresentava uma expressão mais fraca de CD11b, de CD36 e uma expressão heterogénea de CD14. Segundo o esquema de maturação dos monócitos de Orfão (46), estas características fenotípicas estão de acordo com as apresentadas pelos promonócitos, suscitando a dúvida de imaturidade destas células. A presença da expressão de IREM-2 neste subtipo celular veio assim a refutar esta dúvida. Deste modo, seria necessário estudar a maturação de cada subpopulação monocítica na medula óssea, para uma melhor compreensão do fenótipo apresentado pelas subpopulações minoritárias no sangue periférico.

A comparação do fenótipo obtido nas subpopulações monocíticas com a bibliografia existente é limitada, uma vez que, só alguns marcadores celulares utilizados neste estudo (HLA-Dr, CD11b, CD36 e CD64) estão documentados em estudos anteriores (17,18,65). Tal deve-se ao facto de, em muitos dos estudos realizados, a identificação ser de apenas duas subpopulações monocíticas ( $CD14^{+}CD16^{-}$  e  $CD14^{dim}CD16^{+}$ ), sem fazerem contudo a subdivisão das células  $CD16^{+}$  em  $CD14^{+}$  e  $CD14^{dim}$ . Os resultados obtidos da expressão dos antígenos celulares comuns estão concordantes com os estudos prévios (17,18,65).

Durante a avaliação das características citométricas, observaram-se diferenças estatisticamente significativas na granularidade e no tamanho celular, entre as subpopulações monocíticas. Verificou-se que à medida que os monócitos aumentavam a expressão de CD14 e diminuía a expressão de

CD16, aumentavam a sua granularidade. Assim, os monócitos clássicos possuíam uma maior complexidade celular, ao passo que os monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentaram menor. Relativamente ao tamanho celular, a subpopulação que apresentou maior FSC foi a CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e a subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> a que teve menor FSC. Estes dados estão de acordo com a literatura existente (65).

Exceto para o CD14 e CD16, que foram utilizados para a identificação das subpopulações monocíticas, os marcadores de superfície celular incluídos neste estudo exibiram o mesmo padrão de expressão celular nas subpopulações monocíticas, entre os doentes com ICC e controlos. Em todas as subpopulações monocíticas, os parâmetros HLA-Dr e CD45 apresentaram uma diminuição da sua expressão no grupo de doentes, em comparação com os controlos. Da mesma forma, verificou-se uma diminuição significativa do tamanho celular nos doentes com ICC, nas três subpopulações monocíticas. Contrariamente à diminuição destes parâmetros no grupo de doentes, os antígenos CD4, CD36, CD64 e IREM-2 apresentaram um aumento da sua expressão nos monócitos dos doentes com ICC.

Perante a análise imunofenotípica dos subtipos de monócitos, verificou-se que os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foram as células que expressaram com maior intensidade, vários marcadores da ativação (CD4, CD11b, CD16, IREM-2 e HLA-Dr), assim como os recetores da imunidade inata (TLR2 e TLR4). Foi também a subpopulação que teve um aumento ligeiro no sangue periférico dos doentes estudados, quando comparados com o grupo controlo. Este aumento poder-se-á dever às funções desta subpopulação. Segundo Skrzeczynska-Moncznik *et al.* (17), este subtipo de monócitos apresenta uma capacidade de produção aumentada da citocina IL-10, tendo um papel anti-inflamatório. Como os doentes deste estudo se encontravam numa fase clinicamente estável há pelo menos dois meses, possivelmente encontravam-se numa fase anti-inflamatória, tendo esta subpopulação um papel mais significativo na tentativa de resolução da inflamação crónica.

No futuro, para além do estudo fenotípico dos subtipos de monócitos, seria importante fazer um estudo funcional. Além disso, as funções específicas de cada subpopulação monocítica na IC ainda não foram investigadas.



Para além do estudo fenotípico dos monócitos na IC, também se estudaram fenotipicamente os linfócitos e os neutrófilos.

Os linfócitos são as principais células imunológicas que participam na resposta imunológica adaptativa e reconhecem especificamente o micro-organismo invasor (69).

Existe pouca bibliografia comparando as populações linfocitárias nas doenças cardiovasculares. Num estudo realizado em doentes com cardiomiopatia dilatada idiopática foi observado uma diminuição dos linfócitos T supressores (70). Contrariamente, num estudo efetuado em tecido do miocárdio de doentes com IC em fase avançada da doença, verificaram que os linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) estavam aumentados (70). Yndestad *et al.* (71) verificaram que os linfócitos T se encontravam ativados na ICC, tanto pelo aumento dos níveis de citocinas inflamatórias produzidas, como pelo aumento da expressão superficial de marcadores de ativação (CD25 e CD69).

Neste nosso estudo observou-se uma diminuição da percentagem dos linfócitos nos doentes com ICC. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos publicados (72,73), onde verificaram que a diminuição estava inversamente associada à taxa de mortalidade.

Na comparação das populações linfocitárias entre os dois grupos estudados, apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. Estes resultados não vão de encontro ao estudo realizado por Maisel *et al.* (74), que constatou uma diminuição dos linfócitos circulantes, devido a uma redução dos linfócitos T citotóxicos e das células NK.

Os neutrófilos possuem um importante papel na imunidade inata, sendo as primeiras células a chegar ao local da inflamação. Estas células são caracterizadas pela sua capacidade de fagocitose, de libertar enzimas líticas dos seus grânulos e produzir intermediários de oxigénio reativos com potencial antimicrobiano. Aí efetuam a fagocitose de fragmentos celulares e participam na reparação tecidular pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (75,76).

Neste estudo observou-se um aumento do número de neutrófilos no sangue periférico dos doentes com ICC, o que está de acordo com a literatura publicada (67,77).

Diversos antígenos celulares expressos pelos neutrófilos do sangue periférico foram estudados nos doentes com ICC: CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16 e CD45. Na comparação da expressão dos antígenos pesquisados não se observaram diferenças entre os doentes com ICC e os controlos saudáveis. Apenas se observou uma diminuição estatisticamente significativa do tamanho celular (FSC) e do número de neutrófilos maduros nos doentes com ICC e um aumento de metamielócitos no sangue periférico dos mesmos. O valor e significado destes resultados é algo que terá de ser avaliado em futuros trabalhos.

## **5. Conclusão**



## 5. Conclusão

O presente estudo, embora limitado pela dimensão amostral, demonstrou o papel dos monócitos como mediadores da imunidade inata na insuficiência cardíaca.

Perante a análise do fenótipo dos monócitos, concluiu-se que estas células se podem dividir em três subtipos, com características fenotípicas distintas. Esta heterogeneidade da população de monócitos poderá ser importante para a compreensão da patogénese e progressão da IC.

Neste estudo observou-se uma tendência de aumento da expressão dos recetores de ativação da imunidade inata, os TLR2 e TLR4, nos doentes com ICC. Contudo, em termos estatísticos não se observaram diferenças entre o grupo de doentes e controlos, concluindo que os monócitos dos doentes com ICC não aparentavam uma ativação sustentada da resposta imunológica inata. A estabilidade clínica em que se encontravam os doentes estudados pode ser uma explicação para os resultados obtidos.

O TLR2 e o TLR4 apresentaram diferentes intensidades de expressão em cada subpopulação monocítica, podendo cada subpopulação ter um papel específico na ativação da imunidade inata. A subpopulação CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentou uma diminuição significativa da expressão do TLR2 no grupo de doentes e com o aumento da gravidade da IC. Esta subpopulação foi também a que apresentou uma menor expressão dos recetores da imunidade inata. Deste modo, os monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> poderão desempenhar um papel menos ativo na ativação da imunidade inata.

Pelo contrário, a expressão do TLR2 e TLR4 foi maior nas subpopulações CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, o que poderá indicar um papel mais relevante destes subtipos de monócitos na resposta imunológica inata.

A subpopulação CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> encontrava-se ligeiramente aumentada nos doentes com ICC e foi a que apresentou uma expressão mais intensa de vários antigénios de ativação, assim como dos recetores TLR2 e TLR4. Este aumento também foi acompanhado pela tendência de diminuição dos monócitos clássicos. Os monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> apresentaram uma

diminuição significativa da sua percentagem com o aumento da gravidade nos doentes com ICC.

As diferenças na expressão dos antígenos celulares nas diferentes subpopulações monocíticas e das percentagens de cada subpopulação, poder-se-ão dever às diferentes fases que se encontravam os doentes com ICC, fazendo que cada subtipo seja diferentemente recrutado para a execução das suas funções. Deste modo, são necessários mais estudos para compreender o papel específico de cada subpopulação monocítica na IC.

No futuro seria pertinente efetuar o mesmo estudo em doentes em situação aguda, nos momentos de admissão e de alta hospitalar, bem como efetuar uma reavaliação 2 meses após a alta hospitalar.

## **6. Referências Bibliográficas**





- 1 - Bártholo RM, Bártholo TP. Imunidade inata e a importância dos receptores Toll-similar. Pulmão RJ. 2009; 2: 52-58.
- 2 - Pacheco FC, Cardoso EM. Imunidade Inata e Adaptativa. Fundamentos de Imunologia. 1st Edition. Lisboa: Lidel; 2007.
- 3 - Calich V, Vaz C. Imunologia. 1st Edition. Rio de Janeiro. Revinter; 2001.
- 4 - Roitt I, Brostoff J, Male D. Imunologia. 1st Edition. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1999.
- 5 - Linde A, Mosier D, Blecha F, et al. Innate immunity and inflammation - New frontiers in comparative cardiovascular pathology. Cardiovascular Research. 2007; 73: 26–36.
- 6 - Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, et al. Cardiac Inflammation and Innate Immunity in Septic Shock: Is There a Role for Toll-Like Receptors?. Chest. 2002; 121: 1329-1336.
- 7 - Licastro F, Candore G, Lio D, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. Immunity & Ageing. 2005; 2: 1-14.
- 8 - O’Gorman MRG, Donnenberg AD. Handbook of Human Immunology. 2ª edição. Boca Raton. CRC Press; 2008.
- 9 - Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. Nature clinical practice. 2007; 4: 444-454.
- 10 - Janeway CA, Medzhitov JR. Innate immunity: Lipoproteins take their Toll on the host. Current Biology. 1999; 9: R879–R882.
- 11 - Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell. 2006; 124: 783–801.
- 12 - Kawai T, Akira S. TLR signaling. Seminars in Immunology. 2007; 19: 24–32
- 13 - Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. Current Biology. 2011; 21: R488-R493.

- 14 - Valeur HS, Valen G. Innate immunity and myocardial adaptation to ischemia. *Basic Res Cardiol* 2008; 104: 22–32.
- 15 - Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 388: 621–625.
- 16 - Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2005; 5: 953-964.
- 17 - Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, et al. Peripheral Blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008; 67: 152–159.
- 18 - Tallone T, Turconi G, Soldati G, et al. Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2011; 4:211–219.
- 19 - Frantz S, Bauersachs J, Kelly RA. Innate Immunity and the Heart. *Current Pharmaceutical Design*. 2005; 11: 1279-1290.
- 20 - Valen G. Innate immunity and remodeling. *Heart Fail Rev*. 2011; 16: 71-78.
- 21 - Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med*. 1999; Nov; 5(11):1249-55.
- 22 - Mann DL, Topkara VK, Evans S, et al. Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010; 121: 34-51.
- 23 - Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*. 2001; 13:114–119.
- 24 - Frantz S, Bauersachs J. Toll-like receptors: emerging therapeutic targets for heart failure. *Heart Metab*. 2010; 47: 19-22.
- 25 - Candia AM, Júnior HV, Mesquita ET. Ativação Imune-Inflamatória na Insuficiência Cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89: 201-208.

- 26 - Fonseca C, Ceia F, Brito D, et al. How patients with Heart Failure are managed in Portugal. *Eur J Heart Fail.* 2002; 4: 563-566.
- 27 - Vasan RS, Wilson PWF. Epidemiology and causes of heart failure. [Web page] 2011 [updated 2011; cited 2011 25 outubro]; Available from: [http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-causes-of-heart-failure?source=search\\_result&search=heart+failure&selectedTitle=3%7E150](http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-causes-of-heart-failure?source=search_result&search=heart+failure&selectedTitle=3%7E150).
- 28 - Dickstein K, Solal AC, Filippatos G, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *European Heart Journal.* 2008; 29, 2388–2442.
- 29 - Ceia F, Fonseca C, Mota T et al. Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur J Heart Fail.* 2002; 4: 531-539.
- 30 - Ramrakha P, Hill J. *Oxford Handbook of Cardiology.* 2 edition. New York: Oxford University Press; 2012.
- 31 - McMurray JV, Adamopoulos S, Anker SD et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal.* 2012; 33: 1787–1847.
- 32 - Bocchi EA, Braga FG, Ferreira SM, et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(1): 1-71.
- 33 - Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2001; 104: 2996-3007.
- 34 - Torre-Amione G. Immune Activation in Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol.* 2005; 95: 3C-8C.
- 35 - Montera WM, Almeida DR, Tinoco EM, et al. II Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Aguda. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(3 supl.3): 1-65

- 36 - Vrie M, Heymans S, Schroen B. MicroRNA Involvement in Immune Activation During Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25: 161–170.
- 37 - Mann DL. The Emerging Role of Innate Immunity in the Heart and Vascular System For Whom the Cell Tolls. *Circulation Research.* 2011; 108: 1133-1145.
- 38 - Frantz S, Kobzik L, Kim Y, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of Clinical Investigation.* 1999; 104: 271–280.
- 39 - Wrigley BJ, Lip GYH, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *European Journal of Heart Failure.* 2011; 13: 1161–1171.
- 40 - Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like Receptor 4 With Eritoran Attenuates Myocardial Ischemia. *Reperfusion Injury Circulation.* 2006; 114:270-274.
- 41 - Oyama J, Blais C, Liu X, et al. Reduced Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice. *Circulation.* 2004; 109:784-789.
- 42 - Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, et al. Toll-Like Receptor-2 Modulates Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation.* 2003; 108: 2905-2910.
- 43 - Apostolakis S, Lip GYH, Shantsila E. Monocytes in heart failure: relationship to a deteriorating immune overreaction or a desperate attempt for tissue repair?. *Cardiovascular Research.* 2010; 85: 649–660.
- 44 - Lochem EG, Velden VHJ, Wind HK, et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 2004; 60B: 1–13.
- 45 – Dongen JJM, Lhermitte L, Almeida J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012; 26:1908–1975.

- 46 - Grupo de Orfão A, da Universidade de Salamanca. [http://www.chsp.org.br/pdfs\\_wordpress/congressos/21-LeucemiasAgudas.pdf](http://www.chsp.org.br/pdfs_wordpress/congressos/21-LeucemiasAgudas.pdf)  
Acedido em 23 de Outubro de 2012.
- 47 - Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989; 74: 2527-2534.
- 48 - Ziegler-Heitbrock HWL. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. *Immunology Today*. 1996; 17: 424-8.
- 49 - Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2009; 27: 669–692.
- 50 - Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski. FK Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2010; 121: 2437-2445.
- 51 - Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2011; 106:757–762.
- 52 - Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116: e74-e80.
- 53 - Castanõ D, Garcia LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16b monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*. 2011; 91:348-360.
- 54 - Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001; 69:11-20.
- 55 - Tang Y, Katz SD. Anemia in Chronic Heart Failure: Prevalence, Etiology, Clinical Correlates, and Treatment Options. *Circulation*. 2006; 113:2454-2461.
- 56 – Coats AJS. Anaemia and heart failure. *Heart*. 2004; 90:977–979.

- 57 – Gottlieb SS, Abraham W, Butler J, et al. The Prognostic Importance of Different Definitions of Worsening Renal Function in Congestive Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2002; 8(3): 136-140.
- 58 - Silver MA, Maisel A, Yancy CW, et al. BNP Consensus Panel 2004: A Clinical Approach for the Diagnostic, Prognostic, Screening, Treatment Monitoring, and Therapeutic Roles of Natriuretic Peptides in Cardiovascular Diseases. *Congestive Heart Failure*. 2004; 10(5).
- 59 – Braunwald E. Biomarkers in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2008; 358:2148-2159.
- 60 - Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;9(375):132–140.
- 61 - Anand IS, Latini R, Florea VG, et al. C-Reactive Protein in Heart Failure Prognostic Value and the Effect of Valsartan. *Circulation*. 2005;112:1428-1434.
- 62 - Marques JS, Luz-Rodrigues H, David C, *et al*. Biomarcadores da classe funcional na insuficiência cardíaca sistólica. Relevância da coceptina. *Rev Port Cardiol*. 2012;31(11):701-710.
- 63 - Urra X, Villamor N, Amaro S, et al. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009; 29:994–1002.
- 64 – Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*. 2012;122(1):23-35.
- 65 - Shantsila E, Wrigley B, Tapp L. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011; 9: 1056–1066.
- 66 - Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*. 2000; 243:77–97.

- 67 – Barisione C, Garibaldi S, Ghigliotti G. CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. *Disease Markers*. 2010; 28:115-124.
- 68 –Földes G, von Haehling S, Okonko DO, et al. Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2008; 20(124):80-85.
- 69- Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, et al. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória artigo sistema imunitário – parte I. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50(4):434-61.
- 70 - Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004; 90(4):464–470.
- 71 - Yndestad A, Holma AM, Muller FM, et al. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovascular Research*. 2003; 60:141–146.
- 72 - Charach G, Grosskopf I, Roth A, et al. Usefulness of Total Lymphocyte Count as Predictor of Outcome in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2011; 107:1353–1356.
- 73 - Ommen SR, Hodge DO, Rodeheffer RJ, et al. Predictive Power of the Relative Lymphocyte Concentration in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation*. 1998; 97:19-22.
- 74 - Maisel AS, Knowlton KU, Fowler P, et al. Adrenergic Control of Circulating Lymphocyte Subpopulations: Effects of Congestive Heart Failure, Dynamic Exercise, and Terbutaline Treatment. *J Clin Invest*. 1990; 85:462-467.
- 75 - Carvalho T, Velada I, Valado A, et al. Phenotypic and Functional Alterations on Inflammatory Peripheral Blood Cells After Acute Myocardial Infarction. *J of Cardiovasc Trans Res*. 2012; 5:309–320.

76 - Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews*. 2011; 11:519-531.

77 - Shantsila E, Bialiuk N, Navitski D, et al. Blood leukocytes in heart failure with preserved ejection fraction: Impact on prognosis. *Int J Cardiol*. 2012; 8(155):337-338.

78 - Erickson B, Sperber K, Frishman WH. Toll-Like Receptors New Therapeutic Targets for the Treatment of Atherosclerosis, Acute Coronary Syndromes, and Myocardial Failure. *Cardiology in Review*. 2008;16:273-279.



## **7. Anexos**



### Anexo 1: PAMPs/DAMPs e os TLRs.

Membro da família TLR	Localização do TLR	PAMP	DAMP	Adaptador de sinalização	Factor(es) de transcrição	Citocinas efectoras	
TLR1	Membrana plasmática (superfície celular)	Lipopéptidos tricíclicos (bactéria, micobactéria);	–	TIRAP, MyD88	NF-κB	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.)	
		Factores solúveis ( <i>Neisseria meningitides</i> )					
TLR2		Lipoproteínas/lipopéptidos (vários microorganismos)	hsp60				
		Peptidoglicano (bactérias Gram-positivas)	hsp70				
		Ácido lipoteicoico (bactérias Gram-negativas)	hsp96				
		LAM (Micobactéria)					
		Hemaglutinina (vírus Measles)					
		Fosfolipomannan (Candida)					
		Mucina glicose e fosfatidil inositol (Trypanosoma)					
TLR 3	Endossoma	ARN de dupla cadeia (vírus)	mRNA	TRIF	NF-κB, IRF3,7	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.), IFNs tipo I	
TLR 4	Membrana plasmática (superfície celular)	LPS (bactérias Gram-negativas)	hsp60	TIRAP, MyD88, TRAM e TRIF	NF-κB, IRF3, 7	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.), IFNs tipo I	
		Proteínas de envelope (MMTV)	Domínio EDA da fibronectina				
		Proteína de fusão (VSR)	hsp96				
		Taxol (planta)	hsp70				
		HSP60 ( <i>Chlamydia pneumoniae</i> )	Oligossacarídeos de ácido hialurónico				
			Fragmento polissacarídeo do sulfato de heparina				
			Fibrinogénio				
TLR 5			Flagelina (bactéria)	–	MyD88	NF-κB	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.)
TLR 6		Lipopéptidos diacíclicos (micoplasma)	–	TIRAP, MyD88			
		Factor solúvel termo-lábil ( <i>Streptococos</i> grupo B)					
	Modulina fenol solúvel ( <i>Estafilococos</i> )						
TLR 7	Endossoma	ARN viral de cadeia simples	–	MyD88	NF-κB, IRF7	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.), IFNs tipo I	
		Imidazoquinolina (compostos sintéticos)					
TLR 8		ARN viral de cadeia simples					
TLR 9		ADN CpG não-metilado (bactéria)	Complexos Cromatina-IgG				
		Hemozoína (Plasmódio)					
		ADN viral de dupla cadeia					
TLR 11 (expresso no rato)	Membrana plasmática (superfície celular)	Factores de bactérias uropatógenicas	–		NF-κB	Citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-6-etc.)	
		Molécula profiling-like ( <i>Toxoplasma gondii</i> )					

Abreviaturas: ADN, Ácido desoxirribonucleico; ARN, Ácido ribonucleico; CpG, Citidina-fosfato-guanosina; HSP, Proteína choque térmico; LAM, *Lipoarabinomannan*; LPS, Lipopolissacarídeo; MMTV, *Mouse mammary tumor virus*; VSR, *vírus sincicial respiratório*; Tabela adaptada de Kumar *et al.*, (15), Erickson *et al.*, (78).